

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase de datte (*Phoenix dactylifera* L. cv Tedala) par l'acide benzoïque.

Devant le jury :

Président M. Benaceur Farouk

Rapporteur M. Gouzi Hicham

Examineur M. Leboukh Mourad

Université Amar Téliidji-Laghouat

Université Amar Téliidji-Laghouat

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Présenté par :

M^{lle}. GHAFARI Karima

Mdm. LAKHALE Noura

Soutenu publiquement le : 15 Mai 2018

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biochimie Appliquée

THEME

**Etude cinétique de l'inhibition de la polyphénol
oxydase de datte (*Phoenix dactylifera* L. cv Tedala)
par l'acide benzoïque.**

Devant le jury :

Président M. Benaceur Farouk

Rapporteur M. Gouzi Hicham

Examineur M. Leboukh Mourad

Université Amar Téliidji-Laghouat

Université Amar Téliidji-Laghouat

Université Kasdi Merbah-Ouargla

Présenté par :

M^{lle}. GHAFARI Karima

Mdm. LAKHALE Noura

Soutenu publiquement le : 15 Mai 2018

Remerciements

Tout d'abord, louange à Dieu qui nous a donné la santé, la force et le courage dans la vie et tout au long de notre cycle d'étude.

Nous tiens à exprimer notre sincères remerciement à Monsieur Gouzi Hichame, responsable de cette étude, pour avoir accepté des nos' encadrer, pour le choix de thème et pour avoir participé a la correction de ce manuscrit a fin de réalise cette étude, ses conseils pratiques, techniques, et scientifiques durant nos travaux du mémoire, Merci infiniment.

Nous voudrions aussi remercier les membres de jury qui ont bien voulu trouver un peu de temps pour évaluer notre travail et pour les conseils prodigués et l'apport d'information judicieuses dans le parachèvement de ce labeur.

Au terme de ce travail, qui a été réaliser dans les laboratoires du département de Biologie, nous tiens à remercie tous les ingénieurs de laboratoire pour leurs accueil et leur patience.

Il demeure important pour nos d'exprimer nos plus sincères remerciements à toutes celles et ceux qui, de près ou loin, aidé à réaliser ce projet de fin d'étude.

LAKHALI ; N et GHEFFARI ; K

Dédicace

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, Je dédie ce
modeste travail :*

*A ma très chère mère, sans elle je ne suis pas pu être ce que je suis,
en reconnaissance de leur efforts, leur amour et leur encouragement
durant toutes mes études et mes recherches, et surtout leur disponibilité de garder mes
enfants.*

*A mon très cher mari Bachire, en signe d'amour et de gratitude pour
m'avoir supporté, soutenu et surtout compris en permanence, ces encouragements, sa
fidélité et sa gentillesse.*

*Sans lui, je ne saurais pu progresser et en arriver à l'achèvement de ce travail.
A mes très chères petits enfants, Louai, Mohamed et Fouzi Chihabe qui m'ont porté
bonheur.*

*A mes chers frères et sœurs
ainsi qu'à leurs petites familles.*

*A mes beaux parents ben Harzellah et Zohra, et a tous
ma belle famille pour leurs gentilleses et leurs soutiens.*

A tous mes amis

LAKHALÉ Noura

Dédicaces

*Comme le parcours de la vie m'a donné l'occasion d'exprimer ma profonde gratitude, Je
dédie cet humble travail à :*

*A ma très chère mère
Symbole d'amour et d'affection*

*A mon père
Qu'il trouve ici le fruit de son sacrifice et son encouragement*

A mes chères frères et sœurs

A mes chères filles

A tous mes amis

A tous ceux qui m'aiment avec toute mon affection

GHEFFARI KARIMA

Résumé. Ce présent travail a pour objectif d'étudier la cinétique de l'inhibition de la polyphénol oxydase (PPO) extraite à partir de datte (*Phoenix dactylifera* L. cv Tedala) par l'acide benzoïque. L'activité enzymatique a été mesurée par spectrophotométrie à 410 nm, dans les conditions optimales (pH 5.0; 30°C), en présence de pyrocatechol comme substrat. La PPO de la datte Tedala est fortement inhibée par l'acide benzoïque. Le degré d'inhibition de l'enzyme dépend de la concentration de l'inhibiteur. La valeur IC_{50} de l'acide benzoïque est estimée à 3.87 mM. La représentation de Lineweaver-Burk montre que l'acide benzoïque est un inhibiteur compétitif de l'activité de la PPO avec une valeur de K_{IS} de 1.93 mM.

L'acide benzoïque peut être utilisé pour le contrôle du brunissement enzymatique de la datte Tedala pendant son stockage.

Mots clés : dattes, Tedala, polyphénol oxydase, acide benzoïque, Inhibition, brunissement enzymatique.

Abstract. This work aims to study the inhibition kinetics of polyphenol oxidase (PPO) extracted from Tedala dates (*Phoenix dactylifera* L cv. Tedala) with benzoic acid as inhibitor. PPO activity was measured spectrophotometrically at 410 nm under optimal condition (pH 5; 30 °C) using pyrocatechol as substrate. PPO activity was strongly inhibited with benzoic acid. The degree of inhibition of PPO depends on the concentration of the inhibitor. The IC_{50} value for benzoic acid was estimated to be 3.87 mM. The Lineweaver-Burk representation indicates that benzoic acid inhibit PPO with competitive mode with a K_{IS} value of 1.93. The benzoic acid can be used as anti-browning agent during storage of Tedala date.

Keywords: Datte, Tedala, Polyphenol oxidase, acid benzoic, Inhibition, enzymatic browning.

ملخص

يهدف هذا البحث إلى دراسة النشاط التثبيطي لإنزيم البونيفينول أكسيداز المستخلص من تمر التدالا بواسطة حمض البنزويك. تم قياس النشاط الإنزيمي للإنزيم ب جهاز القياس الطيفي عند 410 نانومتر مع توفير الشروط الملائمة لأفضل نشاط للإنزيم (درجة حموضة 5 و درجة حرارة 30 درجة مئوية)، مع وجود البيروكتشول كدعامة. تم تثبيط لإنزيم البونيفينول أكسيداز المستخلص من تمر التدالا بواسطة حمض البنزويك بحيث درجة تثبيط الإنزيم تتعلق بتركيز المثبط، وكانت قيمة IC_{50} لحمض البنزويك تقارب 3.87 mM. إن حمض البنزويك مثبط تنافسي لنشاط إنزيم بوليفينول أكسيداز مع قيمة Lineweaver- Burk يشير تمثيل K_S تساوي 1.93. يمكن استعمال حمض البنزويك من أجل مراقبة التشوه الإنزيمي لتمر التدالا خلال فترة التخزين و الحفظ.

الكلمات المفتاحية : تمر ، التدالا، حمض البنزويك ، البونيفينول أكسيداز، تثبيط ، التشوه الإنزيمي

Liste des figures.....	II
Liste des tableaux.....	III
Liste des abréviations.....	IV
INTRODUCTION.....	01
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES DATTES, LA POLYPHENOL OXYDASE (PPO)	
Chapitre 01 : généralité sur les dattes	
I. Le palmier dattier	03
I.1. Généralité.....	03
I.2. La classification botanique.....	03
I.3. La répartition géographique.....	04
II. La datte	04
II.1. Définition	04
II.2. Formation et maturation de la datte.....	05
II.2.1. Loulou ou Hababouk.....	05
II.2.2. Khalal ou Kimri, Blah.....	06
II.2.3. Bser ou Bsir, Bissir.....	06
II.2.4. Martouba ou Routab.....	06
II.2.5. Tamar ou Tmar.....	06
Chapitre 02 : Caractérisation des polyphénols oxydases	
I. Caractérisation des polyphénols oxydases	07
I.1. Historique.....	07
I.2. La réaction de brunissement enzymatique.....	07
I.3. Définition des polyphénols oxydases	08
I.4. Caractérisation structurale des PPO.....	09
I.5. Les propriétés générales des PPO	10
I.6. Mécanisme réactionnel et substrat.....	11
I.7. Rôle physiologique des PPO	12
I.8. Inhibition des PPO	13
I.8.1. Méthode physique	13
I.8.2. Méthode chimique	13
I.9. L'acide benzoïque.	14
I.10. Les pyrocatéchols.....	14
LES PROCEDURES EXPERIMENTALES	
I. Matériels et méthode	
I.1. Matériels.....	15
I.1.1. Matériels biologiques.....	15
I.1.2. Produits chimiques.....	15
I.2. Méthodes	15
I.2.1. Préparation de l'extrait brut de la PPO.....	15
I.2.2. Mesure de l'activité de PPO.....	16
I.2.3. Effet du PH.....	16
I.2.4. Etude de la stabilité thermique.....	17
I.2.5. Effet de la concentration de l'enzyme.....	17
I.2.6. Détermination des paramètres cinétiques.....	18
I.2.7. Détermination des valeurs d'IC ₅₀	18

I.2.8. Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque.....	18
I.2.9. Analyse des résultats expérimentaux.....	19
RESULTATS ET DISCUSSION	
I.1. Extraction de la polyphénol oxydase des dattes.....	20
I.2. Les conditions optimales de l'activité pyrocatechol oxydase	21
I.2.1. Effet du PH.....	21
I.2.2. Etude de la stabilité thermique.....	22
I.2.3. Effet de la concentration de l'enzyme.....	23
II Détermination des paramètres cinétiques	24
II.1. Etude de l'effet de la concentration du substrat	25
III. Détermination de la valeur d'IC ₅₀ de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de la PPO.....	28
IV. Etude Mécanisme cinétique d'inhibition de l'activité du poly phénol oxydase de la variété par l'acide benzoïque.....	30
CONCLUSION	34

Figure 1: Datte et noyau du palmier dattier.....	05
Figure 2 : Stades d'évolution de la datte	06
Figure 03 : Les différentes réactions catalysées par les polyphénols oxydase.....	09
Figure 04 : Différentes formes réactionnelles du cuivre dans les PPO	10
Figure 05: Structure de l'acide benzoïque.....	14
Figure 06 : Structure de pyrocatechol.....	14
Figure 07 : La variété de datte Tedala.....	15
Figure 08 : Extrait brut de la datte (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Tedala) avant et après centrifugation.....	16
Figure 09: Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) « Tedala »...	20
Figure 10: Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala en fonction du pH.....	21
Figure 11 : Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala	22
Figure 12 : Effet de la concentration de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol	24
Figure 13 : Effet de la concentration du pyrocatechol sur la vitesse initiale d'oxydation par la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Tedala(a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.	25-26
Figure 14: L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Tedala).....	29
Figure 15: Graphique de Lineweaver-Burk de l'inhibition non compétitive de l'activité de la PPO des dattes (<i>Phoenix dactylifera</i> L cv Tedala) par l'acide benzoïque.	31
Figure 16 : Représentation de l'inhibition compétitive.....	31
Figure 17: schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive.....	32

Tableau 1 : Stades de développement des dattes	05
Tableau 02 : Caractéristiques des polyphénol oxydases de différentes sources végétales.....	10
Tableau 03 : Substrats de polyphénol oxydases de quelques fruits	11
Tableau 04 : Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de pyrocatechol comme substrat.....	27
Tableau 05 : Les valeurs d'IC ₅₀ de l'acide benzoïque trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différents substrats.....	30
Tableau 06 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de l'activité enzymatique de la PPO de (<i>Phoenix dactylifera L</i>) cv Tedala en utilisant le pyrocatechol comme substrat.....	33

A0 : L'activité enzymatique sans traitement thermique.

At : l'activité après traitement thermique.

°C: Degrés Celsius

DOPA : di-hydroxy-phenylalanine

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique acide

g : Gramme

IC₅₀ : concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 %.

K_i : constance de dissociation du complexe E-I

K_m : constante de Michaelis-Menten.

M : Molaire.

Min : minute

ml : Millilitre

mM : MiliMolaire.

nm : Nano mètre

Pa : Pascal

PPO : polyphénol oxydase

PVPP : polyvinyle (poly) pyrrolidone

R² : coefficient de régression linéaire.

[S] : concentration du substrat.

trs : tours de centrifugation

V₀ : vitesse initiale

V_{max} : vitesse maximale

μl : microlitre

INTRODUCTION

La datte, est le fruit du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. produit dans les régions sahariennes considéré comme un aliment de grande importance pour la population habitant ces régions. Dans le sud Algérien, les dattes constituent un aliment fondamental pour les musulmans durant toutes les saisons et particulièrement pendant le mois sacré de Ramadhan.

La datte est un aliment historique de grande valeur énergétique car elle est une source riche en glucides, en fibres alimentaires, en composés phénoliques, en vitamines et en macroéléments faisant d'elle un aliment naturel nutritif pour l'humanité (**Kulkarni et al., 2008 ; Dowson et al., 1963**). Elle est très appréciée aussi bien sur le plan national qu'international.

L'un des problèmes les plus importants des dattes, c'est la réaction de brunissement enzymatique qui se produit au cours de développement des dattes, la récolte, traitement et le stockage. Le brunissement enzymatique est un phénomène largement rencontré chez les fruits et les végétaux, il est le plus souvent une réaction indésirable, provoque la formation d'un pigment brun responsable du changement de couleur, d'odeur et du goût désagréables des dattes (**Martinez et Whitaker, 1995**) et par conséquent diminuant sa qualité nutritionnelle et sa valeur commerciale. La polyphénol oxydase (PPO) est reconnue comme étant la principale enzyme responsable du brunissement des dattes.

La PPO est une métalloenzyme à cuivre largement distribuée dans la nature et détectée dans la plupart des fruits et légumes (**Bertrand, 1896 ; Martinez et Whitaker, 1995 ; Mayer et Harel, 1979**) et (**Vámos-Vigyázó, 1981 ; Casañola-Martín et al., 2006**). En présence de l'oxygène moléculaire, cette enzyme catalyse deux réactions bien distinctes : l'o-hydroxylation des monophénols en o-diphénols (activité crésolase) (EC 1. 14. 18. 1) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (activité pyrocatecholase) (EC 1. 10. 3. 2) qui se polymérisent pour former un colorant brun ou noir appelé mélanine (**Varoquaux, 1978**).

L'inactivation de la PPO par les inhibiteurs chimiques est l'une des méthodes de contrôle la plus efficace pour la prévention du brunissement enzymatique. Cependant, leur utilisation ne peut être possible que s'ils n'ont aucun effet toxique, ne modifient ni le goût ni la couleur des produits et le traitement n'est pas coûteux (**Mc Evily et al., 1992; Sapers, 1993**).

Au cours des dix dernières années, certains rapports ont été consacrés sur l'étude de l'inhibition de la PPO de différentes sources par des acides organiques y compris l'acide benzoïque comme étant anti-brunissement dans l'industrie alimentaire (**Queiroz et al., 2011**). Par contre, l'inhibition de la PPO de datte n'a pas suscité l'attention similaire. Pour cela, l'objectif principal de cette étude était d'évaluer l'effet inhibiteur de l'acide benzoïque sur l'activité de la PPO des dattes « *Phenix dactylifera* L cv Tedala » et de déterminer le mécanisme d'inhibition en utilisant le pyrocatechol comme substrat phénolique.

Notre travail sera présenté en quatre parties et est séquencé comme suit. La première partie concerne un rappel bibliographique sur la datte, la polyphénol oxydase (PPO) et sur le brunissement enzymatique et sa prévention. Dans la deuxième partie, nous mettrons en évidence les procédures expérimentales. La troisième partie est dédiée à une discussion des résultats expérimentaux conduits lors de ce mémoire. Une récapitulation succincte des résultats ainsi que les perspectives ouvrant la voie à des études ultérieures sur la PPO, sont regroupées dans la dernière partie.

*Synthèse bibliographique sur
Les dattes, la polyphénol oxydase
(PPO)*

Chapitre 01 :
Généralité sur les dattes

I- Le palmier dattier

I.1-Généralité

Le nom grec de genre *Phoenix*, repris en latin, peut avoir comme origine la Phénicie, pays exportateur de dattes, mais aussi l'oiseau fabuleux qui renaît de ses cendres tandis que *Dactyl* en grec signifie doigt et datte, d'autre part le philosophe grec Aristote décrivait ce fruit comme un « doigt de lumière » (**Djerbi., 1994**).

C'est une composante essentielle de l'écosystème oasien grâce à sa remarquable adaptation aux conditions climatiques, sa haute valeur nutritive de ses fruits, ses multiples utilisations des ses produits ainsi que sa morphologie favorisant d'autres cultures sous-jacentes (**El homaizi et al., 2002; Bakkaye., 2006**).

Comme toutes les espèces du genre *Phoenix*, il existe des arbres mâles appelés communément dokkars ou pollinisateurs et des arbres femelles Nakhla .En général, les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (**Ghazi et Sahraoui., 2005**).

I.2-La classification botanique

Les Palmiers sont des Monocotylédones, au même titre que les Graminées. Cela signifie qu'ils sont dépourvus de cambium, tissu indifférencié assurant la production des organes nouveaux (**Kahn., 1997**).

Selon **Munier (1973)**, la classification du palmier dattier est comme suit :

Embranchement	Phanérogames.
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones.
Groupe	Phoenocoides.
Famille	Arecaceae.
Sous-famille	Coryphoideae.
Genre	<i>Phoenix</i> .
Espèce	<i>Phoenix dactylifera</i> L

I.3-La répartition géographique

Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient. L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (**Toutain., 1996**).

Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fût introduit au XVIII ème siècle. Sa culture n'a débutée réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes (**Bougedoura., 1991; Matallah., 2004**). Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (**Matallah., 2004**).

D'autre part les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement, pour une superficie de 120830 hectares, cependant 4 wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar22%, El-oued21% et Ouargla 15% (**Anonyme., 2002**).

II-La datte

II-1 Définition

La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair. (**Buelguedj., 2001**).

Selon **Espiard (2002)**, la partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée d'un :

- *Péricarpe* ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.
- *mésocarpe* généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue.
- *endocarpe* de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (Figure1)

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Djerbi., 1994**).

La chair et le noyau représentent environ 85 à 90% du poids total du fruit (Hussein et al., 1998).

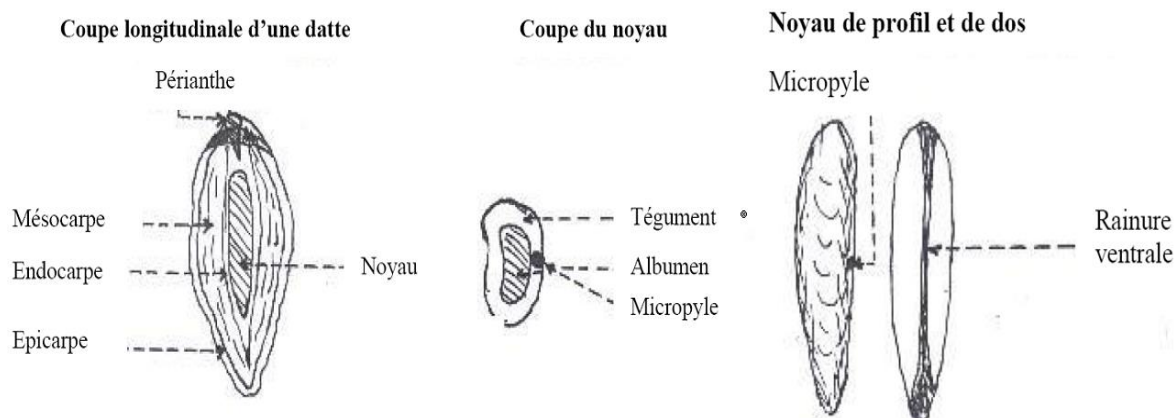


Figure 1: Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj., 2001).

II.2. Formation et maturation de la datte

Les fleurs fécondées, à la nouaison, donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (Gilles., 2000).

La datte passe par différents stades d'évolution avec leur noms vulgaires utilisés en Afrique du Nord et en Irak sont présentés ainsi dans le tableau ci-contre.

Pays	Stades de développement de la datte				
	I	II	III	IV	V
Irak	Hababouk	Kimiri	Khlal	Routab	Tamr
Algérie	Loulou	Khlal	Besr	Martouba	Tamr
Libye	-	Gamag	Bser	Routab	Tamr
Mauritanie	Zeï	Tefejena	Engueï	Blah	Tamr

Tableau 1 : Stades de développement des dattes (Djerbi., 1994).

De nombreux auteurs ont adapté la terminologie utilisée en Irak. Les différents être définis comme suit:

II.2.1. Loulou ou Hababouk

C'est le stade "nouaison" qui vient juste après la pollinisation. Les dattes ont une croissance lente, une couleur verte jaunâtre et une forme sphérique (Figure 2). Il dure 4 à 5 semaines après fécondation. (Djerbi., 1994).

II.2.2. Khalal ou Kimri, Blah

Ce stade dur sept semaines environs, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins. (Djerbi., 1994).

II.2.3. Bser ou Bsir, Bissir

Les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge et au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade (Figure 2). Il dure en moyenne quatre semaines. (Djerbi., 1994).

II.2.4. Martouba ou Routab

C'est le stade de la datte mûre pour certains cultivars. Le poids et la teneur en eau vont diminuer à la fin. La durée de ce stade où le fruit prend une couleur brune est de 2 à 4 semaines. (Djerbi., 1994).

II.2.5. Tamar ou Tmar

C'est la phase ultime de la maturation au cours de laquelle, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose).

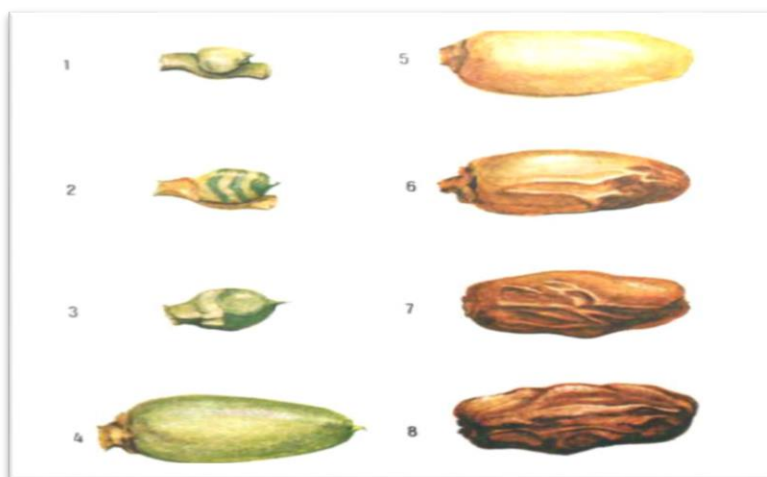


Figure 2 : Stades d'évolution de la datte (Munier., 1973)

(1-2 : Stade I ou Loulou, 3-4: Stade II ou Khlal, 5-6: Stade III ou Bser, 7: Stade IV ou Routab 8:Stade V ou Tmar).

Chapitre 02 :
Caractérisation des polyphénols
oxydases

I. Caractérisation des polyphénols oxydases

I.1. Historique

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (**Whitaker., 1995**).

La polyphénol oxydase a été extraite pour la première fois simultanément par **Kubowitz (1938)** à partir des pommes de terre et par **Keilin et Mann (1938)** à partir d'*Agaricus bisporus*.

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (**Lerch., 1983; Jolivet et al., 1998**). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomeabatas* (**Klabund et al., 1998**), et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (**Seo et al., 2003; Halalouili et al., 2006; Virador et al., 2010; Cheng et al., 2013; José et al., 2014**).

I.2. La réaction de brunissement enzymatique :

Le brunissement enzymatique est un processus chimique, impliquant des polyphénols oxydase telles que Laccase et Pyrocatechol-oxydase donnant une couleur brune. Le brunissement enzymatique nécessite la présence de l'oxygène, ce qui se produit par exemple quand une pomme est coupée ou blessée. La concentration en cuivre joue un rôle très important dans cette réaction. (**Barrett et al, 2005**)

Les phénols oxydés lors du brunissement sont responsables en partie de la flaveur et de la couleur des fruits et légumes. (**Shahidi et Naczk, 2004**).

Le brunissement enzymatique peut avoir lieu lors de :

- La croissance des fruits, c'est l'exemple de la datte (**Mann, 2008**).
- Ou durant l'endommagement mécanique lors du traitement et des manipulations post récolte. (**Man, 1999**).
- la conservation et des transformations technologiques. (**Jeantet et al., 2006**).

La formation des pigments bruns n'est cependant pas toujours indésirable ; un certain degré de brunissement est en effet recherché lors de la maturation des fruits secs (dattes, pruneaux et raisins) (**Jeantet et al., 2006**).

I.3. Définition des polyphénols oxydases :

Les polyphénol oxydases appartiennent au groupe des oxydoréductases renfermant du cuivre. Elles sont connues sous le nom de tyrosinase, polyphénolase, phénolase, pyrocatechol-oxydase, crésolase, pyrocatecholase ou ortho-diphénol oxydase est largement trouvée dans la nature (**Whitaker, 1996**). Elles catalysent l'oxydation des composés phénoliques en présence d'oxygène.

Désignée originellement sous le code EC 1.14.18.1 par la Commission Internationale sur les Enzymes.

La PPO existe sous deux formes, comme critère de différenciation, la spécificité vis-à-vis des substrats phénoliques (**Walker et Ferrar, 1998**) :

1. La monophénol monooxygénase ou crésolase EC 1.14.18.1 est responsable à la transformation de monophénol en diphénol.

2. La pyrocatechol oxydase EC1.10.3.1 permet l'oxydation des o-diphénol en quinone. Les laccase EC 1.10.3.2 catalysent l'oxydation aussi d'o-diphénol de p-diphénol, Elles sont secrétées en abondance par les champignons au cours de leur croissance (**Perry et al., 1993**).

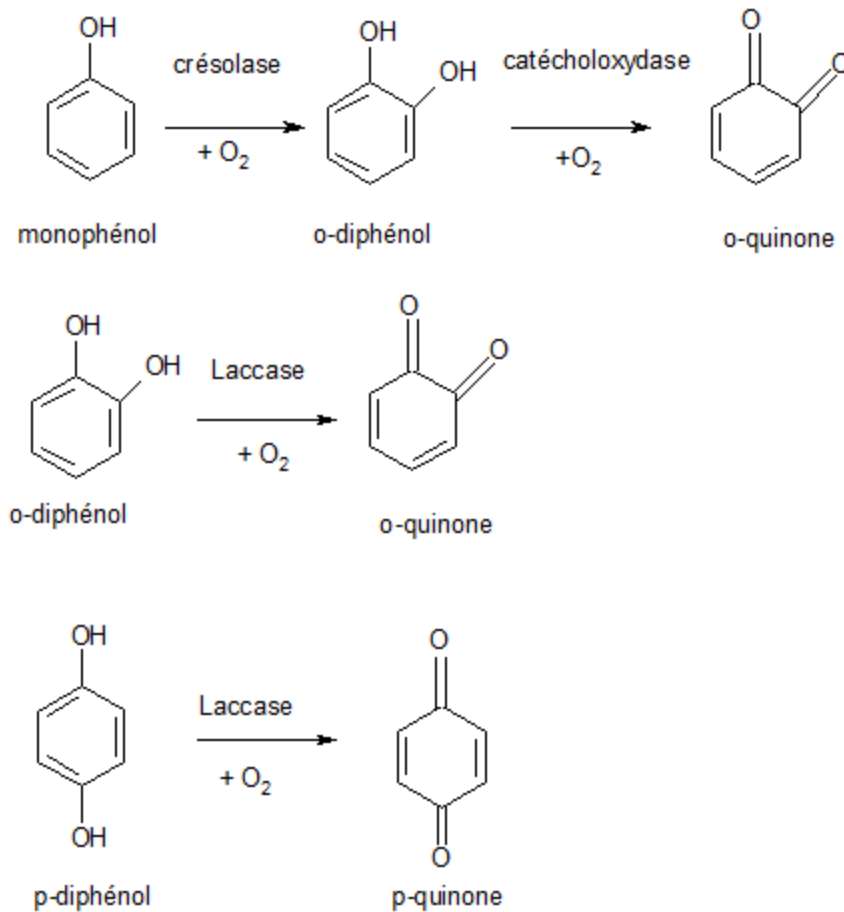


Figure 03: Les différentes réactions catalysés par les polyphénol oxydase(Rigal, 2001).

I.4. Caractérisation structurale des PPO :

Les masses moléculaires apparentes des polyphénols oxydases sont comprises entre 12 et 400 KDA. (Zawistowski et al., 1991), Ces différences de taille s'expliquent notamment par l'existence de formes polymériques de l'enzyme, pouvant aller du monomère, comme c'est le cas pour la PPO des graines de tournesol à la forme tétramérique pour la ppo de champignon.

La structure du site actif de l'enzyme, dans laquelle le cuivre est lié par six ou sept résidus histidine et un résidu cystéine unique est hautement conservée (Mayer, 2006

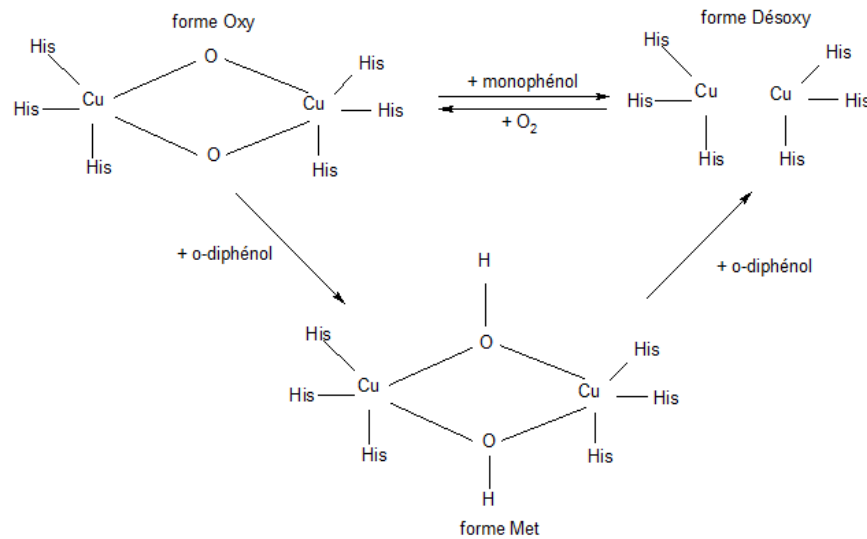


Figure 04 : Différentes formes réactionnelles du cuivre dans les ppo

I.5. Les propriétés générales des ppo :

Le pH optimum de la PPO varie considérablement avec la plante source, mais est généralement dans la plage de 4,0 à 8,0 (Yoruk et Marshall, 2003). Les pH et températures optimaux ainsi que la constante d'affinité apparente des polyphénols oxydases de différentes plantes vis-à-vis de certains substrats sont présentés dans le **tableau 02**

Tableau 02 : Caractéristiques des polyphénol oxydases de différent sources végétales

Plante	Substrat	Km (Mm)	Température optimale	PH optimal	Référence
Pomme	Pyrocatecho	34	15	7	Oktay et al. (1995).
Banane	Pyrocatecho	8.5	30	7	Unal (2007)
Datte Deglet Nour	4-méthyl pyrocatecho	-	35	6.4	Daas Amiour et Hambaba(2016)
Datte Ghars	4-méthyl pyrocatecho	-	40	7.2	Daas Amiour et Hambaba(2016)

I.6. Mécanisme réactionnel et substrat :

En présence d'oxygène, la PPO catalyse l'hydroxylation de monophénols aux o-diphénols (l'activité crésolase) et l'oxydation des o-diphénols à leurs o-quinones correspondants (l'activité pyrocatecholase) (Robb, 1984). Les PPOs sont capables d'insérer de l'oxygène dans une position ortho à un groupe hydroxyle existant dans un cycle aromatique, suivi de l'oxydation du diphenol à la quinone correspondante ; l'oxygène moléculaire est utilisé dans la réaction (Mayer, 2006) .

Le brunissement enzymatique s'observe chez les végétaux riches en composés phénoliques (Jeantet et al., 2006). En effet, le degré de brunissement dépend de la teneur en phénols et de l'activité de la polyphénol oxydase (PPO) (Zawistowsky et al., 1991). Le brunissement post-récolte des fruits est principalement dû à la rupture des anthocyanes et l'oxydation des composés phénoliques (Whitaker, 1994).

Une large gamme de composés phénoliques est oxydée par la PPO (Sapers, 1993). Les différents substrats de la PPO mis en évidence dans plusieurs travaux de recherche sur le brunissement enzymatique sont donnés dans le tableau 03.

Tableau 03: Substrats des polyphénol oxydases de quelques fruits (Marshall et al., 2000)

Source	Composés phénoliques
Pomme	Acide chlorogénique, pyrocatechol, catéchine, acide caféique, 3,4 dihydroxyphenylalanine (DOPA), acide 3,4-dihydroxy benzoïque, 4-méthyle pyrocatechol, leucocyanidine, acide p-coumarique , flavonols glycosides
Banane	Dopamine, leuco-delphinidine, leucocyanidine.
Pêche	Acide chlorogénique, pyrogallol, 4-méthyle pyrocatechol, pyrocatechol, acide caféique, acide gallique, catéchine, Dopamine.
Abricot	Acide isochlorogénique, acide caféique, 4-méthyle pyrocatechol, acide chlorogénique, catéchine, épicatechine, pyrogallol, pyrocatechol, flavonols, acide p-coumarique et dérivés.
Prune	Acide chlorogénique, catéchine, acide caféique, pyrocatechol, DOPA.

I.7. Rôle physiologique des ppo :

Chez les bactéries et les champignons, le taux des PPO augmente avec l'apparition des corps fructifiants (le taux de corps fructifiant augmente avec la présence de tyrosine et de sels de cuivre). La formation de spores s'accompagne d'une augmentation du taux de mélanines découlant de l'action des PPO mais ces mélanines ne sont pas indispensables à la sporulation.

Ces mélanines permettraient d'augmenter la résistance de la paroi et des membranes vis-à-vis d'enzymes de déstructuration (glucanase, chitinase...). Chez les végétaux, les PPO seraient impliquées dans les phénomènes de défense et de résistance aux infections bactériennes, fongiques et virales. On constate généralement une augmentation de l'activité des PPO à la suite d'un stress, hausse qui serait due à la maturation des formes latentes des PPO par les protéases des pathogènes plutôt qu'à une synthèse de novo.

Bien que les PPO puissent hydroxyler des monophénols, elles ne sont pas impliquées directement dans la biosynthèse des diphénols car d'une part la crésolase agit très lentement et d'autre part il n'y a aucune corrélation entre la biosynthèse des diphénols et la présence ou l'absence des PPO dans le tissu végétal intact. Les PPO seraient cependant impliquées dans la biosynthèse des flavones glycosylées. (Mayer, 2006).

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme interviendrait dans la photosynthèse ou dans la régulation du niveau d'oxygène actif au sein des chloroplastes. Certains auteurs ont montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la plupart des végétaux supérieurs. Il n'a pas été possible de démontrer clairement l'implication des PPO au niveau des chaînes d'oxydation cellulaire.

L'activité de la PPO a également un impact sur la saveur et l'arôme des produits horticoles, puis que les composés phénoliques jouent un rôle dans le goût amer, sucré, piquant, ou astringent des fruits, de légumes et d'épices (Tomas- Barberan et Espin, 2001).

I.8. Inhibition des ppo :

L'inhibition des PPO se fait par deux méthodes Physique et chimique.

I.8.1. Méthode physique :

Les traitements thermiques de courtes durées aux températures comprises entre 70-90°C, de la PPO en solution ou dans les produits d'origine végétale sont dans la plupart des cas suffisantes pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction catalytique.

On pourrait utilisés des pressions hydrostatiques dans le cas des polyphénol oxydases sensibles à la pression (pression supérieure à 100 MPa). Toutefois, la température, la pression et la durée du traitement restent des paramètres à optimiser pour une meilleure efficacité.

I.8.2. Méthode chimique :

Une large gamme de composés est connue pour inhiber la PPO. Leur efficacité dépend de la nature et de la concentration de l'inhibiteur, de la source d'enzyme, de la disponibilité du substrat (substrat phénolique) et du pH et de la température (**Zawistowski et al., 1991**).

Quand la PPO est une métalloprotéine, elle peut être inhibée par des agents chélateurs de métal comme le monoxyde de carbone, l'éthylène diamine tétra-acétique acide (EDTA). (**Gasowska et al., 2002**).

Les ions inorganiques tell que K^+ sont également capables d'inhiber les PPOs. (**Rescigno et al., 2002**)

Les acides aromatiques, les aldéhydes aromatiques, les acides carboxyliques et certains acides cinnamiques substitués sont aussi des inhibiteurs des PPO. (**Gasowska et al., 2002**)

Les ions halogénures se comportent comme étant des inhibiteurs compétitifs vis-à-vis de la fixation du dioxygène. Les acides aromatiques, tel que l'acide benzoïque et l'acide cinnamique. (**Rescigno et al., 2002**)

I.9. L'acide benzoïque :

L'acide benzoïque est une espèce chimique communément utilisée comme conservateur et présente dans quelques plantes à l'état naturel. L'acide benzoïque est donc très employé dans l'agroalimentaire et est référencé (selon la législation européenne) sous le code E210.

Leur formule est C_6H_5COOH , dérivé du benzène. L'acide benzoïque est produit industriellement par oxydation partielle du toluène par l'oxygène en phase gazeuse en présence de catalyseurs tels que des sels de cuivre.

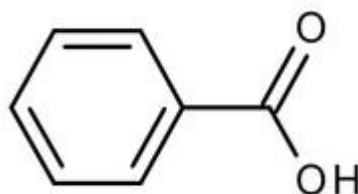


Figure 05 : Structure de l'acide benzoïque

I.10. Les pyrocatechols

Sont les substrats les plus simples sont les pyrocatechols et leurs dérivés. Ce sont des dérivés diphenoliques dont la structure de base est analogue à celle représentée dans la figure suivante.

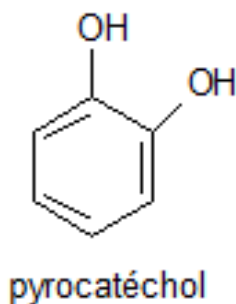


Figure 07: Structure de pyrocatechol

Les procédures expérimentales

Matériels et méthode

I .1. Matériels

I.1.1. Matériels biologiques

La datte (Variété Tedala) utilisée dans notre étude a été achetée à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat dans la semaine son utilisation. Les dattes sont lavées avec de l'eau distillée, séchées et conserver à 4°C



Figure 08: La variété de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Tedala.

I.1.2. Produits chimiques

Le phosphate de potassium (KH_2PO_4), l'acétate de sodium, le pyrocatechol, l'acide benzoïque et le polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) sont fournis par fluka .Tous les autres produits chimiques et réactifs utilisés dans cette étude sont d'un grade analytique.

I.2. Méthodes

I.2.1. Préparation de l'extrait brut de la PPO:

La PPO a été isolée à partir des dattes de la variété Tedala, selon le protocole d'extraction développé par **Hasegawa(1980)**

Les dattes sont lavées avec l'eau distillée et séchées à l'air libre. 200g de chair de dattes refroidie préalablement à -15°C sont dénoyées et découpées et broyées pendant 3 min à l'aide d'un mixeur (warning commercial blender 800EG, model BB 90E) dans 300 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de potassium 0.05M à pH 7.0 contenant 5g de polyvinyle (poly) pyrrolidone (PVPP) comme chélateur des composés phénoliques. Le filtrage a été effectué par une simple filtration par le papier filtre. Le filtrat obtenu est centrifugé pendant 10 min à 4000tr/min dans une centrifugeuse (Thermo Scientific HeLIOS γ centrifuger, England).

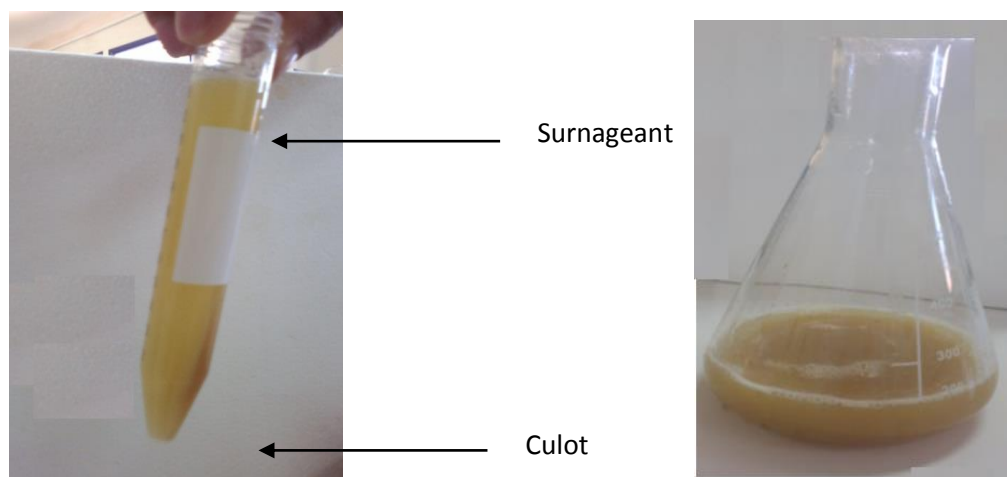


Figure 09 : Extrait brut de la datte (*Phœnix dactylifera* L cv Tedala) avant et après centrifugation.

Le surnageant récupéré d'un volume totale de 150 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait enzymatique brut (PPO) qui divisé dans des tubes Eppendorf de 2 ml qui seront Conservés à -10°C .

I.2.2. Mesure de l'activité de PPO :

L'activité de la poly phénoloxydase est mesurée à 410 nm en utilisant le pyrocatechol comme substrat par la mesure directe de la formation du produit o-quinone à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS γ Spectrophotometer, England). en présence d'oxygène/aire (**Fan et Flurkey, 2004 ; Espin et al ., 1995**).

La solution mère de pyrocatechol à 0.16 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.5mM pour l'assurance de la stabilité de substrat (**Fan et Flurkey, 2004**).

Le milieu réactionnel contient 0,5 ml de substrat à 80mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20 μl d'extrait enzymatique. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant 2 min après l'ajout de l'extrait enzymatique.

I.2.3. Effet du PH

L'activité o-diphénolase de la PPO est mesurée à 30°C dans l'intervalle de pH compris entre 3.5 à 8.0. Les systèmes tampons utilisés sont: le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.0-6.0), le tampon phosphate de sodium (0.05 M; pH 6.0-8.0). Le pyrocatechol à 80mM est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

I.2.4. Etude de la stabilité thermique :

L'activité pyrocatecholase résiduelle de l'extrait brut de la PPO est mesurée après 10 minutes d'incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur contenant 20 µl d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 à 90°C.

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.0 pour la variété de Tedala (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30 C°, en présence de 80 mM du pyrocatechol comme substrat.

Le pourcentage de l'activité pyrocatecholase résiduelle de la PPO est calculé par comparaison de l'activité de l'enzyme non traitée thermiquement avec celle de l'enzyme traité thermiquement (**Doğan et al., 2005**). L'activité enzymatique résiduelle est calculée à partir de la formule suivante :

$$AR_{(\%) } = \left(\frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

Où:

A_0 est l'activité sans traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30C°)

A_t est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

I.2.5. Effet de la concentration de l'enzyme :

La vitesse initiale de l'oxydation de la pyrocatechol à 80 mM par la PPO de Tedala est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 70 µl. L'activité enzymatique à été mesurée dans les conditions optimales décrites ci-dessus (pH 5.0, tampon acétate de sodium 0.05 M et à 30C°).

I.2.6. Détermination des paramètres cinétiques :

Pour déterminer les paramètres cinétiques (K_m et V_{max}) de l'activité pyrocatechol oxydase de l'extrait brut de la PPO des dattes (*Phoenixdactylifera* L.) cv Tedala, l'activité enzymatique est mesurée à pH : 5.0, tampon acétate de sodium à 0.05 M et à 30°C, à différentes concentrations de pyrocatechol comprises entre 10 à 80 mM .

Les valeurs des paramètres cinétiques ont été estimées à l'aide des représentations graphiques de Michaelis-Menten (V_0 vs $[S]$) et de Lineweaver-Burk (1934) ($1/V_0$ vs $1/[S]$).

I.2.7. Détermination des valeurs d'IC₅₀ :

Cette valeur correspond à la concentration d'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique par 50 % (IC₅₀).

L'activité de la PPO a été mesurée à 30°C et pH 5.0 (tampon phosphate 0.05 M), en absence et en présence de différentes concentrations d'inhibiteurs : d'acide benzoïque entre 5 et 40 M, pour une concentration constante de pyrocatechol.

Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées à partir de la représentation de l'activité enzymatique résiduelle en fonction de la concentration de l'inhibiteur (acide benzoïque) (**Chen et al, 1998**). Le pourcentage de l'activité enzymatique résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'activité de l'inhibiteur (A_0) (**Dogan et al, 2005**) selon l'équation suivante :

$$AR(\%) = \left(\frac{A_1}{A_0} \right) \times 100$$

Avec :

A_0 : est l'activité diphénolase en absence d'inhibiteur

A_1 : est l'activité diphénolase en présence d'inhibiteur

Toutes les expériences ont été réalisées 2 fois.

I.2.8. Détermination du mécanisme d'inhibition de la PPO par l'acide benzoïque :

L'activité enzymatique de la PPO est mesurée dans un milieu réactionnel en absence et en présence de deux concentrations constantes d'inhibiteur (15 et 30mM pour l'acide benzoïque) et à différentes concentrations croissantes de la pyrocatechol comprises entre 10 et 80 mM. Les types d'inhibition ont été déterminés à partir de la représentation en double inverse de Lineweaver-Burk de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat (**Arslan et Doğan, 2005**).

I.2.9. Analyse des résultats expérimentaux :

Toutes les analyses de ce travail ont été effectuées trois fois et la moyenne des résultats est présentée. La barre d'erreur représente l'erreur standard. L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par ajustement à l'aide de régression linéaire, et de régression non linéaire par l'utilisation des programmes suivants : Table Curve 2DTM (Jandel Scientific Windows v2.03 Copyright© 1989-1994), et Excel® (Microsoft Excel 97-2003). EnzymeKineticsPro™ Version 2.36, SigmaPlot 2004 (Windows Version 9.01) et Origin 6.0 (Microcal(TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

Résultats et discussions

I.1. Extraction de la polyphénol oxydase des dattes :

La PPO a été facilement isolée à partir de la variété de datte (*Phoenix dactylifera* L.) cv Tedala à l'aide d'un protocole simple à mettre en œuvre. L'extrait enzymatique brut est capable de catalyser l'oxydation de pyrocatechol comme substrat.

L'utilisation de polyvinyl(poly)pyrrolidone (PVPP) l'extraction de la PPO des dattes permet d'éliminer les composés phénoliques endogènes des dattes qui peuvent être oxydés par l'enzyme en o-quinones et qui après leur polymérisation provoquent l'inactivation de la PPO (Wuyts *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007).

Le diagramme de l'extraction de la PPO de cette variété de datte est récapitulé ci contre (Figure 10).

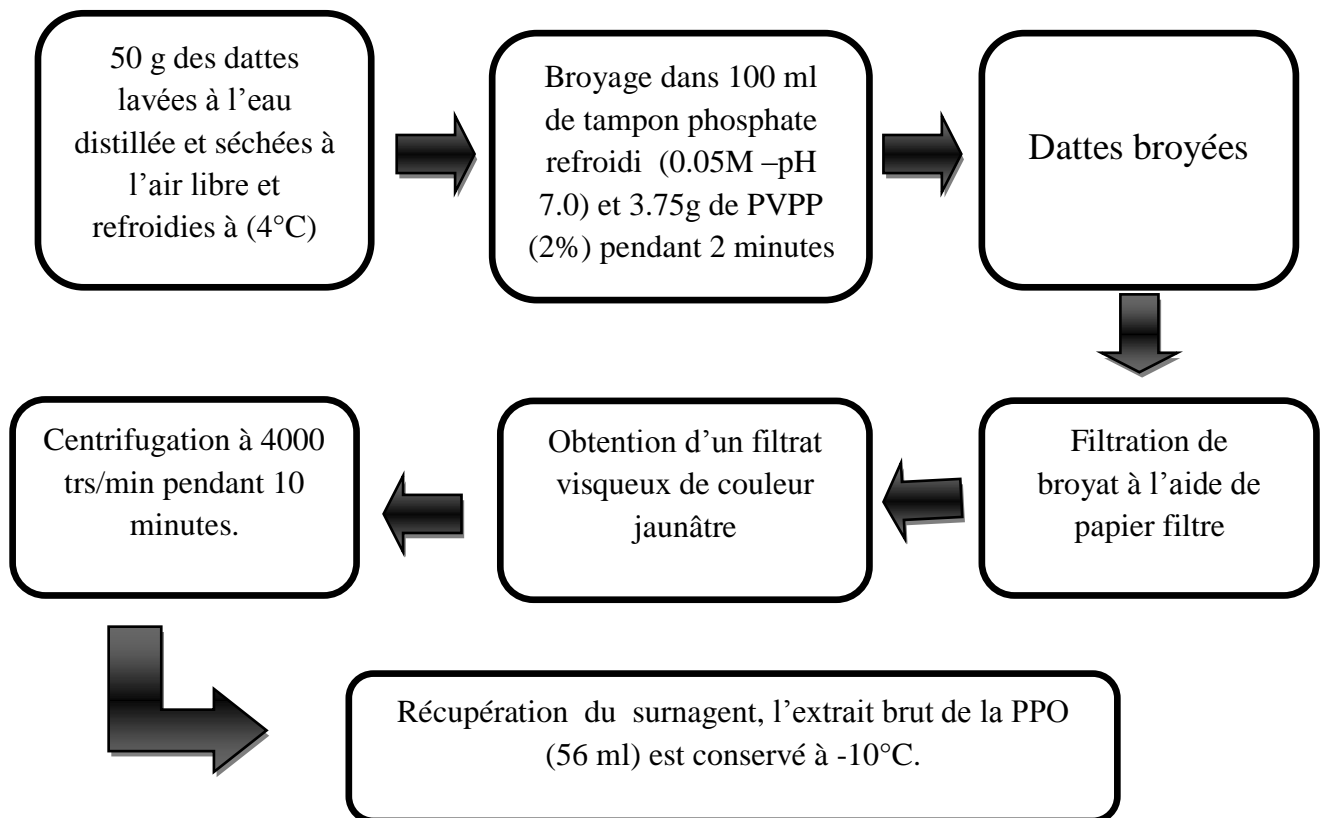


Figure10: Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) « Tedala ».

I.2. Les conditions optimales de l'activité pyrocatechol oxydase :

I.2.1. Effet du pH :

L'influence du pH sur l'activité pyrocatecholase des dattes cv Tedala a été déterminée en mesurant les vitesses initiales d'oxydation du pyrocatechol à différents pH compris entre 3.5 et 8.0.

Les systèmes tampons utilisés sont: le tampon acétate de sodium (0.05 M; pH 3.5-6.0), et le tampon phosphate de sodium (0.05 M; pH 6.0-8.0).

La **figure 11** représente le profil de l'activité pyrocatechol oxydase relative en fonction du pH en présence de pyrocatechol comme substrat. Ainsi, une valeur de pH=5 correspondant au max de pic relativement proportionnelle à l'activité optimale a été déduite. De part et d'autre de ce pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la pyropycatechol ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre le site actif de l'enzyme et le pyrocatechol. (**Khatun et al., 2001**).

En effet, l'activité enzymatique diminue à cause de changement de degré d'ionisation des groupement de ces résidus localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, et qui seront impliqués dans la fixation ou la transformation des substrats (**Khatun et al., 2001**).

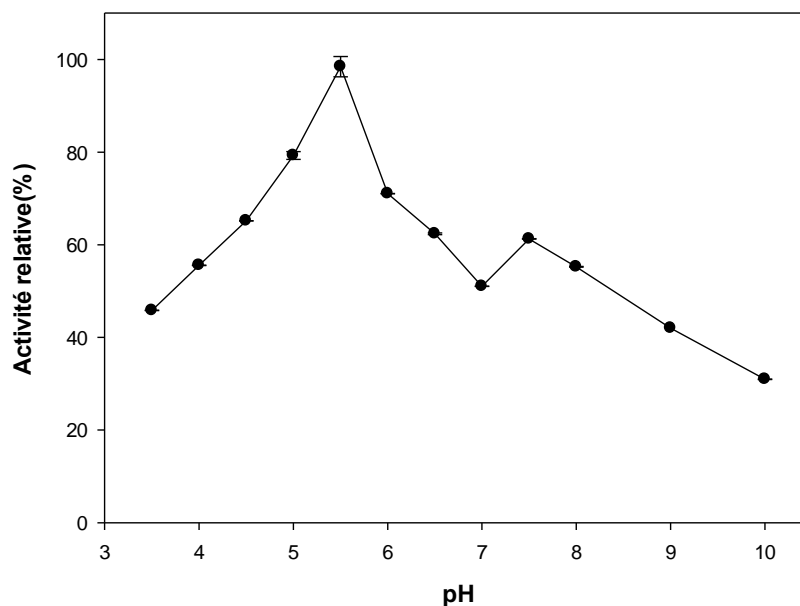


Figure 11: Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Tedala en fonction du pH. (En présence de pyrocatechol comme substrat).

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Yoruk et Marshall., 2003).

Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Vámos-Vigyázó., 1981; Whitaker., 1994; Kolcuoğlu et al., 2006).

I.2.2. Etude de la stabilité thermique :

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes en présence de pyrocatechol, comme substrat sont représentés dans **la figure 12**.

L'activité enzymatique relative a été suivie dans un intervalle des températures compris entre 30 et 90°C en respectant les conditions optimales décrites précédemment dont elle a été mesurée à pH 5.0 et en présence de pyrocatechol à 80 mM.

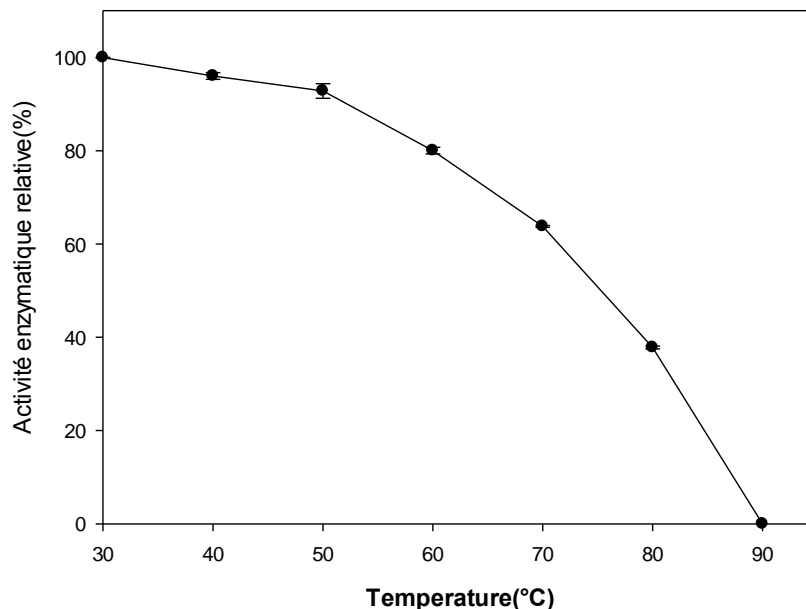


Figure 12 : Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Tedala après 10 min de traitement thermique. (En présence de pyrocatechol comme substrat).

Comme pour la plupart des réactions enzymatiques, la vitesse des réactions catalysées par la PPO augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 50 à 60°C, l'activité catalytique enzymatique diminue. Ce phénomène résulte de deux effets opposés:

- (a) De l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse de la réaction avec la température.
- (b) de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées (Voet., 2011).

Selon la nature du substrat utilisé et la source enzymatique, on remarque que la température optimale est dans la gamme 30-40°C, estimée en présence de pyrocatechol comme substrat.

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour les différentes PPO d'origine végétale: *Penaesus japonicus* (Benjakul et al., 2005), *Macrolepiotamastoidea* (Kolcuoğlu et al., 2006), *Musa cavendishii* (Ünal., 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al., 2005) et *Castanea henryi* (Xut et al., 2004). Plusieurs chercheurs ont indiqué que les PPOs ont des températures optimales entre 20 et 40 °C (Arslan et al., 1997; Aydemir., 2004; Duangmal et al., 1999; Fujita et al., 1995; Jiang., 1999; Gawlik-Dziki et al., 2008).

En effet, la PPO n'est pas une enzyme thermostable, les traitements thermiques de courtes durées à des températures de 70 à 90°C de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale, sont dans la plupart des cas suffisants pour la destruction irréversible, partielle voire totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroglu., 2003).

I.2.3 .Effet de la concentration de l'enzyme

L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol par l'extrait brut de la PPO des dattes a été étudié tout en respectant les conditions optimales précédemment décrites.

La figure 13 représente le résultat de l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité de la PPO de Tedala. Nous constatons que la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol augmente de manière linéaire avec l'augmentation du volume de l'enzyme dans le milieu réactionnel, à partir de cette relation de proportionnalité nous pouvons estimer la valeur de la constante catalytique et par conséquent d'estimer la concentration de la PPO dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale (Weil., 2001).

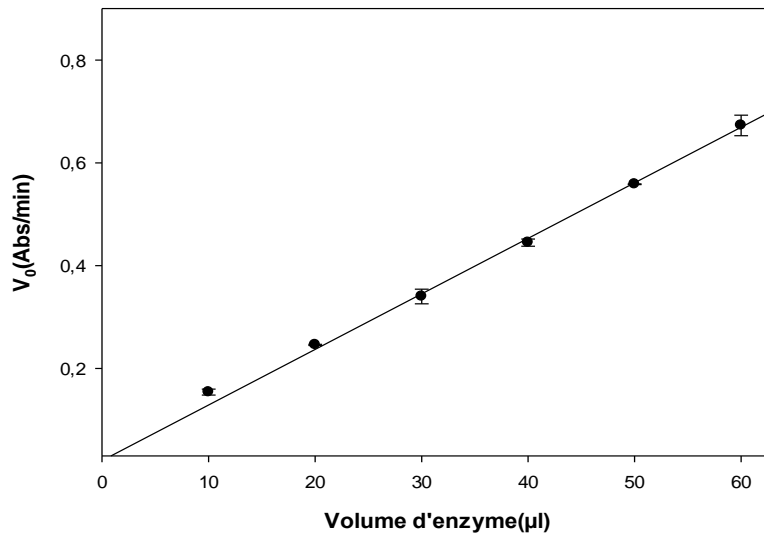


Figure 13 : Effet de la concentration de la PPO de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Tedala sur la vitesse initiale d'oxydation du pyrocatechol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30C° ; pyrocatechol 80 mM)

D'après cette expérience, nous avons choisi le volume de l'enzyme de 20 µl comme étant convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

II. Détermination des paramètres cinétiques :

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la PPO des dattes, les vitesses initiales ont été mesurées à différentes concentrations de pyrocatechol.

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité pyrocatecholase a été étudié dans une gamme de concentration pyrocatechol comprise entre 10 et 80 mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05 mM à pH 5.0 à une température de 30 C°).

Les valeurs des paramètres cinétiques V_{max} , et K_m ont été ainsi estimés à partir des représentations de Michaelis-Menten (Equation (2)) et de Lineweaver-Burk (Equation (3)) comme suit (**Dalmadi et al., 2006**):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad \dots\dots\dots\text{Equation (2)}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right)\left(\frac{1}{[S]}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) \quad \dots\dots\dots\text{Equation (3)}$$

Où :

V_0 : est la vitesse initiale de la réaction (Abs/min) ;

V_{max} : est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min) ;

$[S]$: est la concentration de pyrocatechol (mM) ;

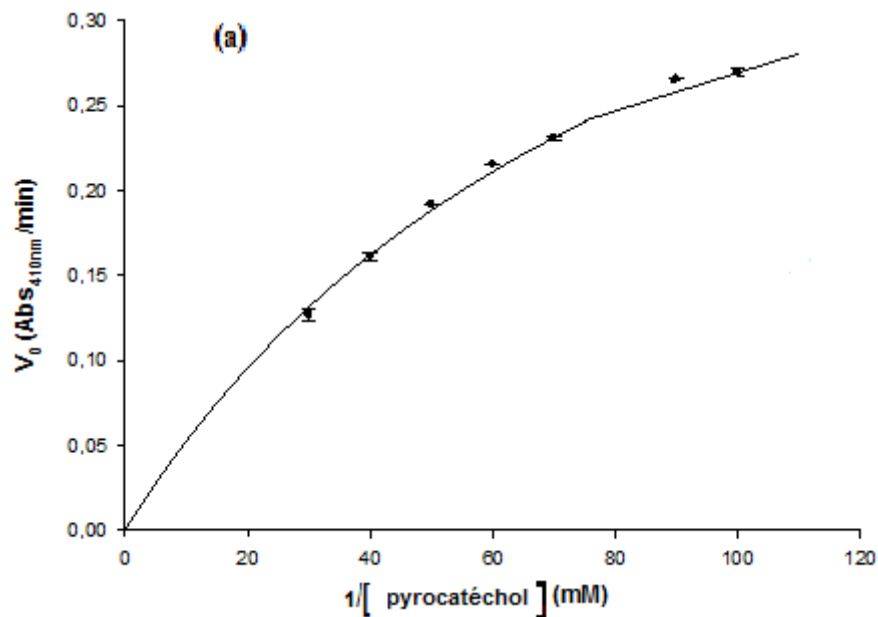
K_m : est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante de Michaelis-Menten.

II. 1. Effet de la concentration du substrat

Le profil d'évolution de l'activité enzymatique de la PPO de la variété des dattes (Cv Tedala) en fonction de la concentration de pyrocatechol est représenté dans **la figure 14**.

Nous remarquons que la représentation graphique donne une courbe d'allure hyperbolique, ce qui signifie que l'enzyme suit une cinétique michalienne.

La courbe $1/V$ vs $[S]$ a été utilisée afin d'évaluer la valeur de la constante de dissociation du complexe inactif ES (K_s). Le phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé pour la PPO de cette variété avec une valeur approximative valant 60 mM.



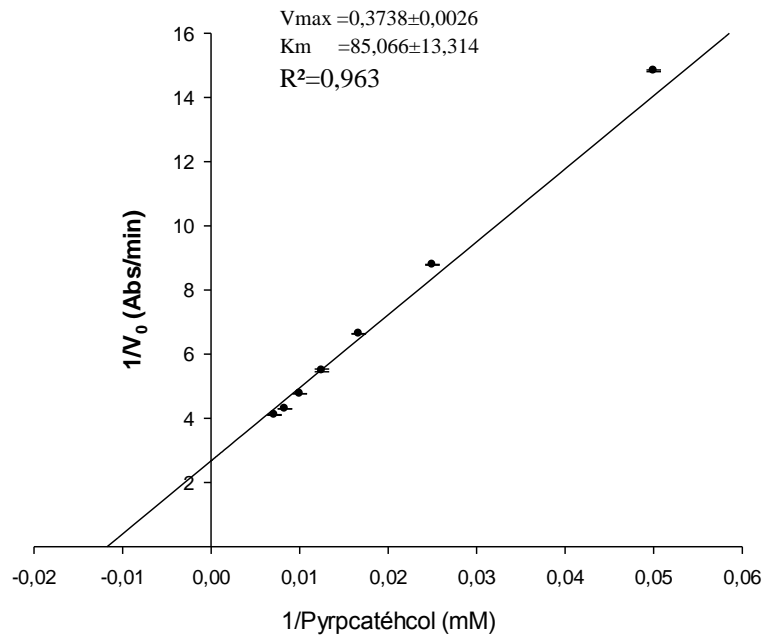


Figure 14: Effet de la concentration du pyrocatechol sur la vitesse initiale d'oxydation par la polyphénol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L) Tedala: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

L'inhibition de la PPO par excès de substrat a été également rencontrée pour les PPO de différentes sources végétales (Tomita et al., 1980; Muñoz et al., 2010). Cet effet peut être dû à la formation d'un complexe actif enzyme-substrat (ES) où le substrat est mal orienté dans le site ou bien à la formation d'un complexe ternaire non actif (ESS) (Muñoz et al., 2010), de même, la fixation d'une deuxième molécule de substrats sur le même site enzymatique retarde son action catalytique (Zawistowski et al., 1991).

Haldane (1930) a suggéré que l'enzyme possède au moins deux sites actifs successifs et voisins dont chacun fixe une molécule de substrat conduisant par conséquent à un complexe inactif.

Les valeurs des paramètres cinétiques (V_{\max} et K_m , et le rapport V_{\max}/K_m efficacité) obtenus à partir de la représentation graphique de double inverse $1/V=f(1/S)$ sont ainsi récapitulées dans le tableau 4.

Tableau 4: Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de pyrocatechol comme substrat

Source	V_{\max} (Abs/min)	V_{\max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	K_m (mM)	V_{\max}/K_m ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mM}$)
Tedala	0.24	$0,3738 \pm 0,0026$	$85,066 \pm 13,314$	0.00442

En effet, les recherches sur les PPOs impliquent généralement l'utilisation de pyrocatechol comme substrat. Selon **Sachde et al., (1989)**.

Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten déterminées pour le pyrocatechol comme substrat pour les PPOs d'artichaut (*Cynarascolymus L.*) (**Dogan et al., 2005**), de poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et pekyardimci., 2004**), de cerise (*Malpighiaglabra L.*) (**Kumar et al., 2008**), de Yam (*Dioscoreacayenensis-rotundata* cv. Longbô) (**Gnangui et al., 2009**), des racines de céleri (*ApiumgraveolensL.*) (**Aydemir et Akkanlı., 2006**); et de banane (*Musa cavendishii*) (**Ünal., 2007**) sont respectivement: 10.7, 5.55, 5.2, 13.93, 29 et 8.5 mM.

Une valeur de K_m de 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinusofficinalis L.*) (**Aydemir., 2010**), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynarascolymus L.*) (**Dogan et al., 2005**), 5.5 mM pour la PPO de la poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et pekyardimci., 2004**), 4.5 mM pour la PPO de coing (**Yağar & Sağıroğlu., 2002**), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighiaglabra L.*) (**Kumar et al., 2008**), 6.3 mM pour la PPO de la mangue (*Mangiferaindica L.*) (**Wang et al., 2007**), 3.65 mM pour la PPO du raisin (*Vitisvinifera L.*) (**Önez et al., 2008**) et 8.3 mM pour la PPO de céleri (*Apiumgraveolens L.*) (**Aydemir et al., 2006**).

Les valeurs de K_m et V_{max} de la PPO varient avec le type du substrat, le tampon, de la concentration ionique, de la température, de la source de l'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (**Arslan et al., 1997 ; Dogan et Dogan., 2003; Ziyan et Pekyardimci., 2004**).

Dogan et al., (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du K_m .

III. Détermination de la valeur d'IC₅₀ de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de la PPO:

L'effet de différentes concentrations d'acide benzoïque, sur l'oxydation de la pyrocatechol sur l'activité enzymatique de la polphénol oxydase des dattes *Phoenix dactylifera L* cv Tedala a été étudié.

Les résultats trouvés, montre que la concentration de l'acide benzoïque dans le milieu réactionnel provoque une diminution significative sur l'activité de la PPO.

La valeur d'IC₅₀ est définie comme étant la concentration de l'inhibiteur qui provoque une diminution de l'activité enzymatique de la PPO par 50% (Chen *et al.*, 1998). On a obtenu une valeur de IC₅₀=3,87 mM en présence d'acide benzoïque.

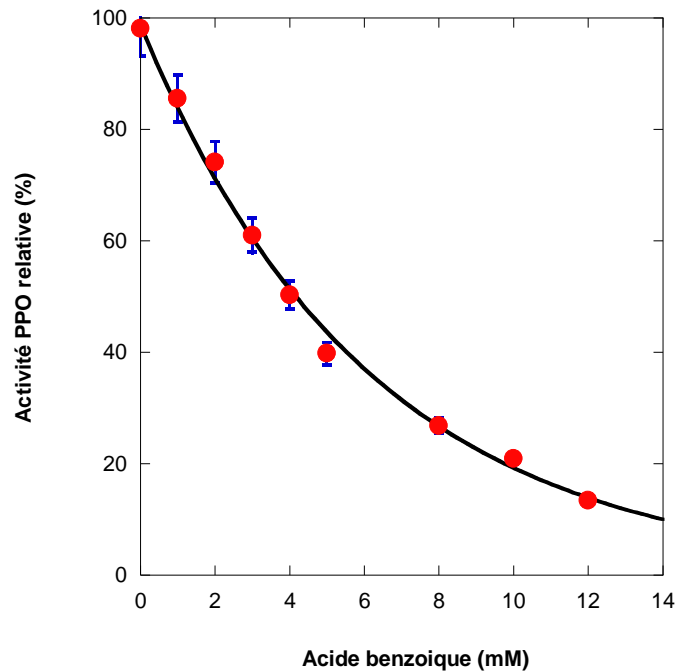


Figure 15: L'effet de la concentration de l'acide benzoïque sur l'oxydation de pyrocatechol par la PPO de dattes (*Phoenix dactylifera L cv Tedala*). Les conditions d'essais : 30°C, 1,0 ml de milieu réactionnel contient 0,05 M de tampon phosphate de potassium (pH 5).

Pour mieux comparer l'effet de l'acide benzoïque sur les PPOs d'origine végétale et celle de notre variété, les valeurs d'IC₅₀ de l'acide benzoïque, trouvées pour la PPO obtenues à partir de différentes sources végétales sont indiquées dans les **Tableaux 05**.

Tableau 05: Les valeurs d'IC₅₀ de l'acide benzoïque trouvée pour la PPO à partir de différentes sources et différentes substrats

Sources	Type de substrat	IC ₅₀ mM	Références
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Tedala	Pyrocatechol	3,87 ±0,081	Notre étude
<i>Phoenix dactylifera L</i> cv Deglet –Nour	Pyrocatechol	0,19 ±0,15	Choul.,2016
Blé <i>Triticumaestivum L.</i>	Pyrocatechol	11.18	Erat et al.,2010
Truffe <i>Terfezia leonis Tul</i>	Pyrocatechol	8.2	Gouzi.,2014
Champignon de Paris <i>Agaricusbisporus</i>	Pyrocatechol	1.00 0,147	Chen et al. 2003 Gouzi et al.,2010

De plus, d'après ces résultats obtenus on constate que le pouvoir inhibiteur de l'acide benzoïque et la valeur d'IC₅₀ peut être influencé beaucoup plus de la source d'enzyme et le type de substrat choisi lors la mesure de l'activité de la PPO des dattes

IV. Etude Mécanisme cinétique d'inhibition

L'effet inhibiteur de l'acide benzoïque sur l'activité enzymatique de l'extrait brut de la PPO des dattes de variété Tedala a été étudié en utilisant le pyrocatechol comme substrat.

Dans les conditions expérimentales utilisées, l'oxydation de pyrocatechol par la PPO des dattes, suit une cinétique de Michaelis-Menten. La cinétique d'inhibition de la PPO de datte Tedela par l'acide benzoïque a été déterminée par l'analyse des représentations graphiques en double inverse de Lineweaver-Burk. Les résultats ainsi trouvés sont représenté dans la figure 14.

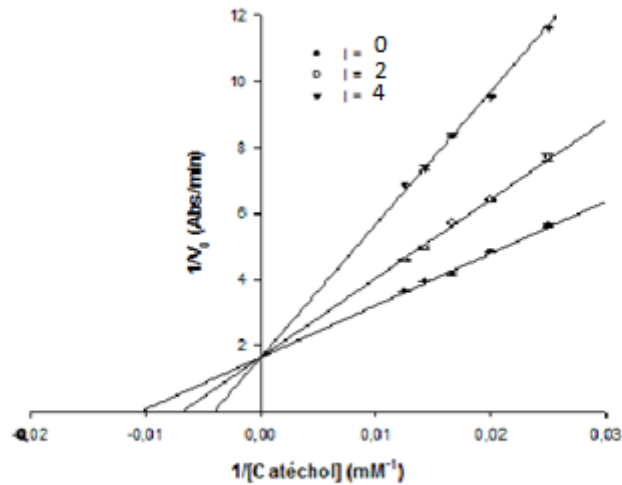


Figure 16: Graphique de Lineweaver-Burk de l’inhibition non compétitive de l’activité de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera L cv Tedala*) par l’acide benzoïque. Dont les concentrations sont 0 (●), 1 (○), et 3 (▼)

En présence d’acide benzoïque la représentation graphique de $1/V_o$ en fonction de $1/[S]$ est un ensemble de courbes droites, de pentes différentes, et qui se croisent l’une sur l’autre sur l’axe des ordonnées. La valeur de V_{max} demeure constante tandis que, la valeur de K_m augmente avec l’augmentation de la concentration de l’inhibiteur.

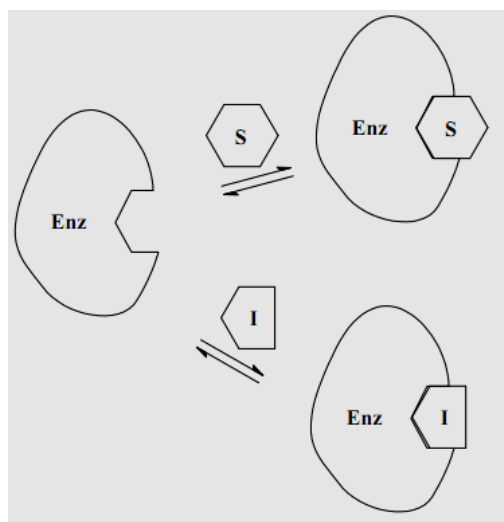


Figure 17 : Représentation de l’inhibition compétitive (Keillor, 2004)

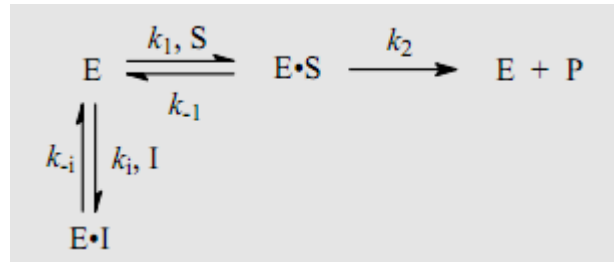


Figure 18: schéma de type Michaelis-Menten de l'inhibition compétitive (Keillor, 2004)

L'équation de Lineweaver-Burk pour l'inhibition compétitive s'écrit comme suit:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{v_{max}} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}}$$

Avec :

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$$

K_I : constante de dissociation du complexe EI (mM) ;

$[I]$: concentration d'inhibiteur (mM).

Les résultats trouvés, montrent que l'acide benzoïque provoque une diminution significative de l'activité pyrocatecholase de la PPO et que son pouvoir inhibiteur, dépend non seulement de sa concentration dans le milieu réactionnel, mais aussi de la concentration du substrat utilisé.

Les valeurs du coefficient de régression linéaire (R^2) et des paramètres cinétiques (v_{max} , K_m et K_I) des représentations de lineweaver-Burk en absence et en présence de l'acide benzoïque pour le pyropycatéchol sont indiquées dans le Tableau (06).

D'après la valeur du coefficient de régression ($R^2 = 0,96$) on constate que les données expérimentales ont été parfaitement ajustées par le modèle cinétique de l'inhibition choisi.

Tableau 06 : Les paramètres cinétiques de l'inhibition de la PPO de datte (*Phoenix dactylifera L.*) variété Tedala en présence du pyrocatechol comme substrat.

Acide benzoïque (mM)	K_I (mM)	K_m (mM)	V_{max} (Abs/min)	R^2	Type d'inhibition
0		85,066±13,314	0,24	0,969	
2	1,93±0,00	150,62 ±9,81	0,64±0,02	0,967	Compétitive
4		262.17±12,08		0,966	

Les valeurs de K_{IS} indiquées dans le Tableau 07 suggère que cet acide organique inhibe efficacement l'activité de la PPO de la variété Tedala en présence de pyrocatechol, de même ce tableau montre que les représentations graphiques de $1/V_0$ en fonction de $1/[S]$, est une série de courbes qui se croisent sur l'axe des ordonnées, avec l'augmentation de la de la valeur de K_m tandis que la valeur de V_{max} demeure constante.

L'acide benzoïque se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat.

La constante d'équilibre de fixation de cet inhibiteur sur l'enzyme libre, K_I , est obtenue à partir de la représentation graphique de la constante de Michaelis-Menten apparente (K_m) en fonction de la concentration de l'acide benzoïque.

L'inhibition compétitive de la PPO par l'acide benzoïque observée dans notre étude, est en accord avec les résultats trouvés pour la PPO de champignons par **Harry et al. (1970)**

Et pour d'autres PPOs obtenues à partir de différentes sources (**Anosike et Ayaebene, 1982; Robert et al., 1997 ;Ziyan et Pekyardimce, 2004 ; Dogan et al., 2005). Gunata et al. (1987) et Robert et al. (1997)** on observe respectivement, une inhibition de type compétitive pour les polyphenol oxydases du raisin et de palme avec l'acide benzoïque en présence du pyrocatechol comme substrat.

Le caractère inhibiteur de l'acide benzoïque est due à la présence du cycle benzène au niveau de sa structure (**Queiroz et al., 2008 ; Pifferri et al., 1974**).

CONCLUSION

La variété Tedala des dattes est un fruit de grande valeur nutritionnelle est commerciale. L'un des problèmes le plus souvent rencontré après la récolte des dattes, c'est le changement de leurs propriétés organoleptiques dues aux problèmes de brunissement. Ce phénomène biochimique est causé principalement par la polyphénol oxydase (PPO). Le contrôle du brunissement enzymatique des dattes est possible avec l'utilisation de certains composés organiques d synthèse capables d'inhiber l'activité de la PPO.

Dans ce travail, la polyphénol oxydase des dattes de la variété Tedala a été tout d'abord extraite puis ses caractéristiques biochimiques ont été déterminées. L'activité de la PPO de Tedala est optimale à pH 5.0 et elle est plus stable thermiquement. La cinétique de l'oxydation de pyrocatechol suit parfaitement le modèle cinétique de Michaelis-Menten.

L'application de l'acide benzoïque comme inhibiteur pour réduire le brunissement dû à l'enzyme PPO des dattes *Phoenix dactylifera L cv Tedala*. est ainsi rapportée pour la première fois. L'activité de la PPO en présence du pyrocatechol comme substrat est fortement inhibée par l'acide benzoïque et le degré d'inhibition de l'enzyme dépend de la concentration de l'inhibiteur dans le milieu réactionnel.

L'analyse des résultats de la cinétique d'inhibition montrent que l'acide benzoïque est un inhibiteur compétitif de la PPO de datte Tedala. Donc ce dernier, se fixe uniquement sur l'enzyme libre et non pas sur le complexe enzyme-substrat. L'acide benzoïque est non toxique et peu coûteux peut être donc utilisé dans l'industrie agro-alimentaire comme agent anti-brunissement des dattes pendant leur stockage et leur transformation.

Comme perspectives, une amélioration du pouvoir inhibiteur de cet acide organique est envisageable, et ceci en faisant appel à d'autres moyens physiques comme la température dont il serait plus intéressant d'étudier l'effet de cet inhibiteur sur les propriétés cinétiques et thermodynamiques de la PPO.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Acourene, S., Buelguedj, M., Tama, M., et Taleb, B. (2001). Caractérisation, évaluation de la qualité de la datte et identification des cultivars rares de palmier dattier de la région des ziban. *Revue Recherche Agronomique*, N° 8. Ed. INRAA, 19-39p.
- Ahmed, J., Al-Jasass, F. M., et Siddiq, M. (2014). Date fruit composition and nutrition. *Dates: Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits*, 261-283p.
- Al-Farsi, M. A., and Lee, C.Y. (2008). Nutritional and functional properties of dates: a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(10), 877-887p.
- Allaith, A.A. (2008). Antioxidant activity of Bahraini date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit of various cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(6), 1033-1040p.
- Aydemir, T., and Akkanli, G. (2006). Purification and characterization of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens*) and the investigation on enzyme activity of some inhibitors. *Int. J. Food Sci Technol.* 41:1090-1099.
- Bakkaye, S. (2006). Lexique phœnicicole en arabe et en mozabite. CWANA, HCA et RAB98/G31. 14-16, 24-25, 31p.
- Barrett, D.M., Somogyi, L.P., and Ramaswamy, H.S. (2005). *Processing fruits (Sciences and Technology)*. Second ed. CRC Press, Orlando, USA, 841 p.
- Barreveld, W. H. (1993). *Date palm products* FAO Agricultural Services Bulletin, FAO, Rome, Italie. 101, 211 p.
- Belguedj, M. (2002). Les ressources génétiques du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du Sud-Est Algérien.
- Bouguederi, L., Maanani, F., Missaoui, M., Bounagua, N., et Dore, J.C. (1994). Analyse typologique d'une population de palmiers dattiers males (*Phoenix dactylifera* L.) au moyen de différentes approches multiparamétriques. *Améliorant. Prod. Agro. Milieu Aride*. 6 : 263-277pp.
- Bouguedoura, N. (1991). *Connaissance de la morphogénèse du palmier dattier. Etude in situ et in vitro du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Mémoire de doctorat. U.S.T.H.B. Alger*. 201 p.
- Buelguedj, M. (2002). Les ressources génétiques du palmier dattier : caractéristiques des cultivars de dattier dans les palmeraies du Sud-Est Algérien. *Revue annuelle de L'INRAA N°1/2002*. 28-289 p.
- Chao, C.T., and Krueger, R. R. (2007). The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses, and cultivation. *HortScience*, 42(5), 1077-1082p.
- Chen, L., and Flurkey, W.H. (2002). Effect of protease on the extraction of crimini mushroom tyrosinase isoforms. *Current topics in phytochemistry*. Vol. 5, 109-120 pp.
- Claus, H., and Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 29. Issue 1, 3-14 pp.
- Clifford, A. (2001). *Wright, Mediterranean vegetables : A Cook's ABC's of vegetables and their preparation in Spain, France, Italy, Greece, Turkey, the Middle East and North Africa with more than 200 Anth.* Harvard Common Press, p 131.
- DaasAmiour, S. (2009). *Etude quantitative des composés phénoliques des extraits de trois variétés de dattes (Phoenix dactylifera L.) et évaluation in vitro de leur activité biologique. Mémoire de magister, Université de Batna*.
- Dalmadi, I., Rapeanu, G., Van Loey, A., Smout, C., and Hendrickx, M. (2006). Characterisation and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: A kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*, 30, 56-76p.
- Djerbi, M. (1994). *Précis de phœniciculture*. FAO, 192 p.

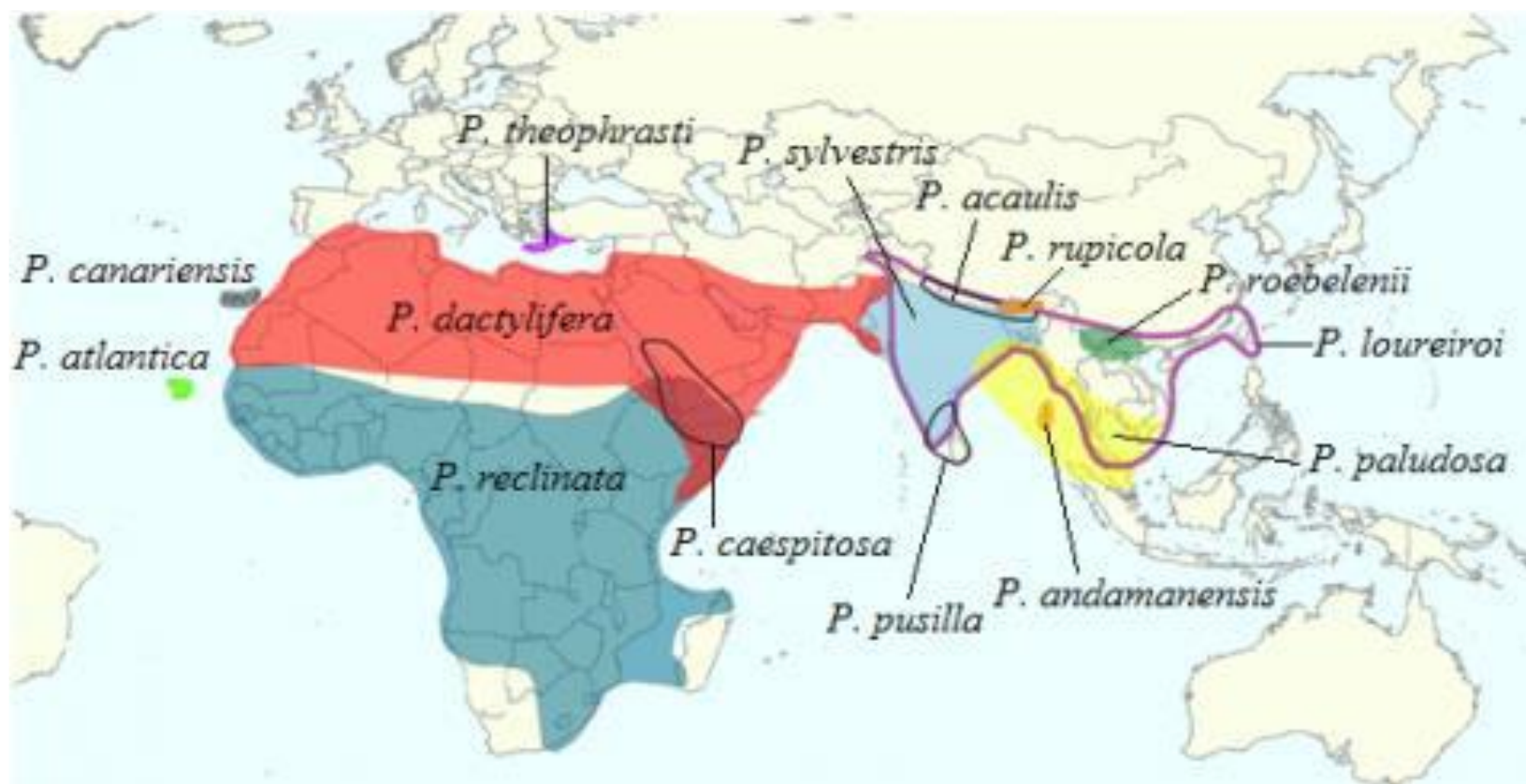
- Djouab, A. (2007). Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Mémoire de Magister. option génie alimentaire, Université de Boumerdès. 24 p.
- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Arslan, O., and Alkan, M. (2005). Purification and characterization of *Ocimum bacilicum* L. Polyphenol Oxidase. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53, No. 26, 10224-10230 pp.
- Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M.-C., Lester, R.N. & Tanksley, S.D. (2002). A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the Solanaceae. *Genetics Society of America* 161, 1697–1711.
- Eidhin, N., Myrphy, E., and O'Beirne, D. (2006). Polyphenol Oxidase from Apple (*Malus domestica* Borkh .cv Bramley' Seedling) purification strategies and characterization. *Journal Of Food Science*. Vol. 71, No. 1, 51-58 pp.
- El-Arem, A., Saafi, E. B., Flamini, G., Issaoui, M., Ferchichi, A., Hammami, M., and Achour, L. (2012). Volatile and nonvolatile chemical composition of some date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) harvested at different stages of maturity. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(3), 549-555p.
- Élisabeth, C. & Millet, R. (1884). *Maison rustique des dames*, Edition Librairie agricole de La Maison rustique, volume 2, p 301. Numérisé en 2009.
- Espiard, E. (2002). *Introduction à la transformation industrielle des fruits*. Ed. Tech et Doc-Lavoisier, 360 p.
- FAO, (2003). *The marketing potential of date palm fruits in the European market*, FAO commodity and Trade Policy Research Working Paper No. 6, Pascal Liu (Ed.), Raw Materials, Tropical and Horticultural Products Service Commodities and Trade Division, FAO, Rome
- Fernandez, D., Lourd, M., Ouinten, M., et Geiger, J. P. (1995). Le Bayoud du palmier dattier: une maladie qui menace la phoéniculture. *Phytoma: la Défense des Végétaux*, (469), 36-40p.
- Furini, A. & Wunder, J. (2004). Analysis of eggplant (*Solanum melongena*)-related germplasm: morphological and AFLP data contribute to phylogenetic interpretations and germplasm utilization. *Theor. Appl. Genet.* 108, 197–208.
- Gouzi, H. and Benmansour, A. (2007). Partial purification and characterization of Polyphenol Oxidase Extracted from *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbatch. *International Journal Of Chemical Reactor Engineering*. Vol. 5. Article A76.
- Habib, H. M., and Ibrahim, W. H. (2009). Nutritional quality evaluation of eighteen date pit varieties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 99–111p.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P. et Brulé G. (2006). *Sciences des aliments*, Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 383 p.
- Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam. (2006). “Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiotamastoides*)” *Food Chemistry*, Vol. 101, 778-785p.
- Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T.C., Murugan, K. (2008). Purification and kinetic characterization of Polyphenol Oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.) *Food Chemistry*. Vol. 110, 328-333 pp.
- LEBEAU, A. (2010). Résistance de la tomate, l'aubergine et le piment à *Ralstonia solanacearum* : interactions entre les gènes de résistance et la diversité bactérienne, caractérisation et cartographie des facteurs génétiques impliqués chez l'aubergine. Thèse de DOCTORAT : Université de LA RÉUNION.

- Liu, P. (2003). The marketing potential of date palm fruits in the European market. FAO Commodity and Trade Policy Research Working Paper (FAO).
- Loison, M. (2006). Légumes anciens, Saveurs nouvelles. Editions France agricole, p129.
- Lou, Q., Iovene, M., Spooner, D.M., Buell, C.R. & Jiang, J. (2010). Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence in situ hybridization mapping. *Chromosoma* 119,435–442.
- Lorenço, E.J., Neves, V.A., and DaSilva, M.A. (2000). Polyphenol oxydase from sweet potato: purification and properties. *J. Agric. Food chem.*, Vol. 40, 2369-2373 pp.
- Lozano, J.E. (2006). Fruit manufacturing Scientific Basis, Engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance. Springer Sciences Business Media, LLC. Bahia Blanca, Argentine. 237 p.
- Lu, S., Luo, Y., Turner, E., and Feng, H. (2007). Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. *Food Chemistry*, 104(2), 824–829p.
- Makhloufi, A. (2010). Etude des activités antimicrobienne et antioxydants de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de Bechar (*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Mémoire de obtenir le grade de doctorat d'état en biologie. Université Abou baker Belkaid. Bechar, 166P.
- Mann, H. S., Alton, J.J., Kim, S., and Tong, C.B. (2008). Differential expression of cell-wall modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(1), 152-157p.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., and Kefalas, P. (2005). Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food chemistry*, 89(3), 411-420p.
- Mappa, D. (2010). Les productions légumières : Cahiers d'activités, Edition Educagri, p 59.
- Munro, D. B. & Munro Ernest Small, D. B. (1998). Les légumes du Canada, Edition NRC Research Press, p 348.
- Marchoux, G., Gognalons, P. & Gébré Sélassié, K. (2008). Virus des Solanacées. Du génome viral à la protection des cultures. Editions Quæ, p 36.
- Marshall, M. R., Kim, J., and Wei, C. (2000). Enzymatic browning in fruits, vegetables and seafoods. FAO: Rome, Italy, 40 p.
- Matallah, M. (2004). Contribution à l'étude de la conservation des dattes variété Deglet-Nour : Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingénieria, INA. El-Harrach. Alger. 79p
- Matsui, K. N., Granado, L. M., De Oliveira, P. V., and Tadini, C. C. (2007). Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut watersimulated solutions. *LWT-food science and technology*, 40(5), 852-859p.
- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places, A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331p.
- Mayer, A., and Harel, E. (1991). Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. *Food Enzymology*, Edited by P.F. Fox (Elsevier Publisher). 373-397 p.
- Mazoyer, M. (2002). Larousse agricole, le monde agricole au XXI émesième. Ed. Mathilde Majorel. 224p
- Messaïd, H. (2007). Optimisation du processus D'immersion- Réhydratation du système dattes sèches-jus d'Orange. Mémoire du diplôme de Magister. Université M'Hamed BOUGUERA-Boumerdès, 96p.
- Messiaen, C.-M., Messiaen-Pagotto, F. (2009). Le potager familial méditerranéen. Editions Quæ, p75.

- Meyer, R. S., Karol, K. G., Little, D. P., Nee, M. H. & Litt, A. (2012). Phylogeographic relationships among asian eggplants and new perspectives on eggplant domestication. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63, 685–701.
- Mimouni, Y. (2015). Développement de produits diététiques hypoglycémisants à base de dattes molles variété «Ghars», la plus répandue dans la cuvette de Ouargla. Thèse de doctorat, Université de Ouargla.
- Munier, P. (1973). Le palmier-dattier. Techniques agricoles et productions tropicales, Maisonneuve et Larose, Paris, France. 221p.
- Murray, M. T. & Pizzorno, J. (2010). The condensed encyclopedia of healing foods, Simon and Schuster Edition.
- Nagai, T., and Suzuki, N. (2001). Partial purification of polyphenol oxidase from Chinese cabbage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 3922.
- Naujeer, H. B. (2009). Morphological diversity in eggplant (*Solanum melongena* L.), their related species and wild type conserved at the National gene bank in Mauritius. Master's thesis. CBM Swedish Biodiversity Center.
- Nonnecke, L. (1988). Vegetable Production. Edition Springer, p 240.
- Noui, (2001). Optimisation de la production de la biomasse *Saccharomyces cerevisiae* cultiver sur extrait de dates. Mémoire d'ing. Agr. Batna. 6p.
- Noui, Y. (2007). Caractérisation physico-chimique comparative des deux principaux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de magister, université Mohamed BOUGUERA Boumerdès, 112 p.
- Nyabyenda, P. (2005). Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : généralités, légumineuses alimentaires, plantes à tubercules et racines, céréales. Presses Agronomiques de Gembloux, volume 1, p 197.
- Önez, Z., Karakus, E., and Pekyardimci, S. (2008). Izmir grape Polyphenol Oxidase (*Vitis vinifera* L) partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. Vol. 32, 398-414 pp.
- Ozenda, P. (2004). Flore et végétation du Sahara. Troisième édition. CNRS édition. 750005 Paris, 92, 438, 662p.
- Palmer, J.K. (1963). Banana Polyphenol oxidase. Preparation and Properties. *Plant Physiology*. 508 513 pp.
- Peyron, G. (2000). Cultiver le palmier dattier. Guide illustré de formation. Quae, France, 112 p.
- Pitrat, M. & Foury, C. (2003). Histoires de légumes : Des origines à l'orée du XXI^e siècle, Editions Quae, p 260.
- Quinten, M. (1996). Diversité et structure génétique des populations algérienne de *Fusarium oxysporum* agent de la fusariose vasculaire (bayouhd) du palmier dattier, Mémoire de doctorat, El Harrach, Alger. 52 p.
- Références bibliographiques
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu, B., Rinaldi, A., and Sanjust, E. (2002). Tyrosinase Inhibition: General and Applied Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, Vol. 17, N° 4, 207 218 pp.
- Richard, A. (1823). Botanique médicale, ou histoire naturelle et médicale : des médicaments, des poisons et des aliments, tirés du règne végétal. Edition Béchet jeune, volume 1, p 291.
- Rivas, N.D.J., and Whitaker, J.R. (1996). Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears. *Plant Physiol*. Vol. 52, 501-507p.
- Rodakiewicz-Nowak, J., and Ito, M. (2003). Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. Vol. 78, Issue 7, 809 pp.

- Rodakiewicz-Nowak, J., and Ito, M.(2007).Effect of water-miscible solvents on the Organic Solvent Resistant Tyrosinase from *Streptomyces* sp. REN-21. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. Vol. 78, Issue 7, 809-816p.
- Roychowdhury, R., Roy, S. & Tah, J. (2011). Estimation of heritable components of variation and character selection in eggplant (*Solanum melongena* L.) for mutation breeding programme. *Continental J. Biological Sciences* 4 (2), 31 - 36.
- Saafi, E. B., Louedi, M., Elfeki, A., Zakhama, A., Najjar, M. F., Hammami, M., and Achour, L. (2011).Protective effect of date palm fruit extract (*Phoenix dactylifera* L.) on dimethoate induced oxidative stress in rat liver. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 63(5), 433-441p.
- Sayah, Z., et Ould ElHadj, M. D.(2010).Etude comparative des caractéristiques physicochimiques et biochimiques des dattes de la cuvette de Ouargla. *Annales des Sciences et Technologie*. (1), Vol. 2: 92p.
- Šukalović, V., Veljović-Jovanović, S., Maksimović, J.D., Maksimović, V., and Pajić, Z. (2010). Characterisation of phenol oxidase and peroxidase from maize silk. *Plant Biology*, 12(3), 406-413p.
- Tomás-Barberán, F. A., and Espin, J.C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876p.
- Whitaker, J. R. (1994).Principles of enzymology for the food sciences. In : New York: Marcel Dekker braz. *J. Food technol.*, Vol.8, N°. 3, pp. 233-242, 2.ed, 625 pp.
- Yağar, H., and Sağıroğlu, A. (2002). Partially Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase of Quince. *Turk J Chem*. Vol. 26, 97-103 pp.
- Yemenicioğlu, A. (2002).Control of polyphenol oxidase in whole potatoes by low temperature blanching. *Eur Food Res Technol*. Vol. 214, 313-319 pp.
- Yoruk, R., and Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review1. *Journal of Food Biochemistry*, 27(5), 361-422p.
- Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. (1991). Polyphenol oxidase. In: *Oxidative enzyme in foods*. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science), 217-273p.

ANNEXE



Annexe 01: Carte de répartition géographique du genre *Phoenix* dans le monde

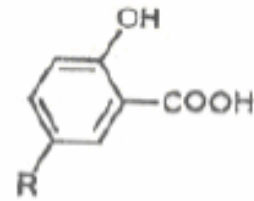
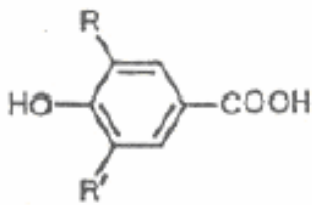
(<http://ethnoecologie.revues.org/1524>)

Annexe 02 : tableaux représente les paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétales

Source	substrat	Vmax	K_m (mM)	Référence bibliographique
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Pyrocatechol	6,97 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	10,7	Dogan et al .,(2005)
	Pyrogallol	13,93	11,6	
	4-méthylpyrocatechol	12,20	05,2	
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	Pyrocatechol	79.5 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	10.7	Kumar et al., (2008)
	pyrogallol	8.8 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	05.2	
	4-méthylpyrocatechol	125 ($\mu\text{M}/\text{min}$)	11.6	
Blé (<i>Triticumaestivum</i>)	Pyrocatechol	3.21(UI/min ml)	0.1243	Erat et al.,(2010)
	Pyrogallol	2.43	0.1040	
	4-méthylpyrocatechol	3.02	0.8861	
Aubergine (<i>Solanummelongena L</i>)	Pyrocatechol	2,34($\mu\text{M}/\text{min}$)	2,973	Todaro et al.,(2011)
	4-methylcatechol	5,55	2.122	
	Acide chlorogénique	2,31	1,351	
Persil (<i>Petroselinumcrispum</i>)	Pyrocatechol	0,39($\Delta \text{Abs}/\text{ml min}$)	$7,9 \cdot 10^{-4}$	Doğru&Erat.,(2012)
	Pyrogallol	0,07	$7,4 \cdot 10^{-4}$	
	4-méthylpyrocatechol	0,05	$9,7 \cdot 10^{-4}$	
	L-Dopa	0,02	$1,5 \cdot 10^{-4}$	
	Dopamine	0,35	5,93	
	Catéchin	0,06	$1,6 \cdot 10^{-2}$	
Radis (<i>Raphanussativus</i>)	Acide gallique	233(UI/min ml)	04,2	Goyeneche et al. ,(2013)
	Acide pyrogallique	4348	06,3	
	Acide chlorogénique	302	07,2	
	L-tyrosine	495	09,3	
	Pyrocatechol	1587	28,3	
	Acide caféique	1695	77,0	

Tableau 03 : Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

Source	Substrat	pH optimum	Température optimale	Référence bibliographique
<i>Chien-rose</i> (<i>Rosa dumalis</i> Rechst)	Catéchol	8,5	25	Sakiroglu et al., (1996)
	4-méthylcatéchol	8,5	20	
	Pyrogallol	7	15	
	L-Tyrosine	7	65	
	P-cresol	5	60	
<i>Murier blanc</i> (<i>Morus alba</i> L.)	Pyrogallol	7,5	20	Arslan et al., (2005)
<i>Banane</i> (<i>Musa cavendishii</i>)	Catéchol	7	30	Ünal et al., (2007)
	Catéchol	7	40	
Cerise (<i>Malpighiaglabra</i>)	L-Tyrosine	5,2	47	Kumar et al., (2008)
	Pyrogallol	8	30	
<i>Blé</i> (<i>Triticumaestivum</i>)	Catéchol	4,5	40	Erat et al., (2010)
	Catéchin	5	35	
	pyrogallol	5	30	
	L-dopa	5	40	
	Dopamine	4,5	35	
		5	35	
	4-méthylcatéchol	5	35	
Persil (<i>Petroselinumcrispum</i>)	Catéchol	4	40	Doğru et Erat., (2012)
	4-Methylcatechol	4	40	
	Pyrogallol	8,5	35	
	L-Dopa	4,5	45	
	Dopamine	8	45	
	Catéchin	4	35	
<i>Radis</i> (<i>Raphanussativus</i>)	Catéchol	7	40	Goyeneche et al., (2013)
	Pyrogallol	7	20	
<i>Chèvrefeuille</i> (<i>Lonicerajaponica</i>)	L-Dopa	7,5	25	Na-Na et al., (2013)



(1) $R = R' = H$; acide *p*-hydroxybenzoïque

(2) $R = OH, R' = H$; acide protocatéchique

(3) $R = OCH_3, R' = H$; acide vanillique

(4) $R = R' = OH$; acide gallique

(5) $R = R' = OCH_3$; acide syringique

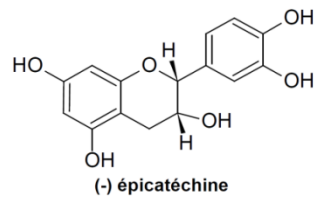
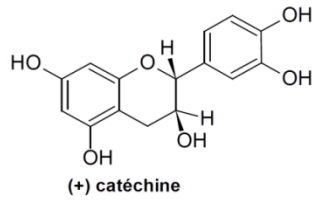
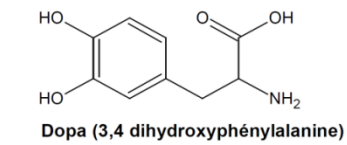
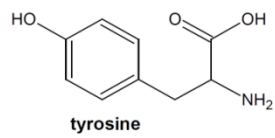
(1') $R = H$; acide salicylique (acide *o*-hydroxybenzoïque)

(2') $R = OH$; acide gentisique

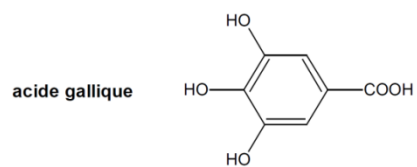
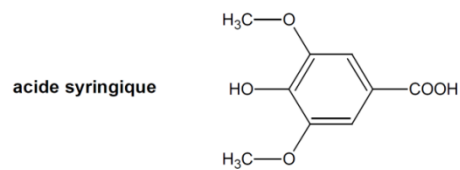
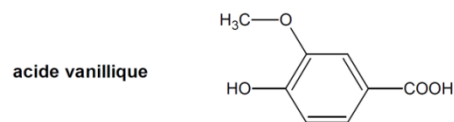
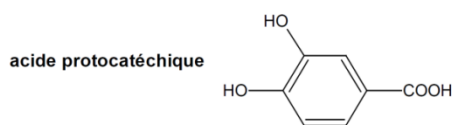
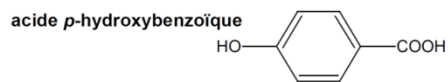
Annexe 04: Structures chimiques des acides benzoïques d'après (Ribéraeu-Gayon, 1968)

Annexe 05: Tableau représente quelque type d'inhibiteurs du brunissement enzymatique (McEVILY et *al.*, 1992).

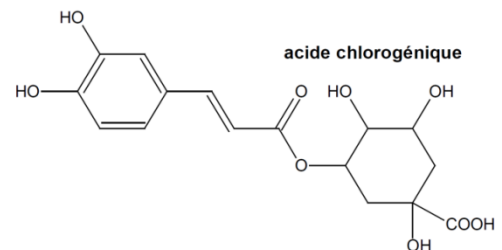
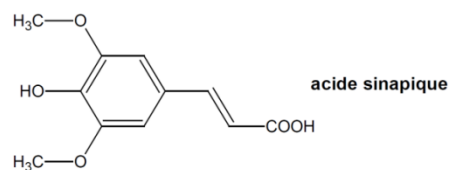
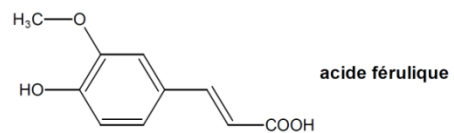
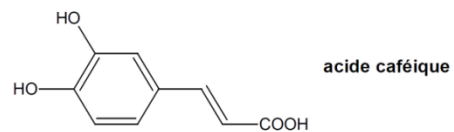
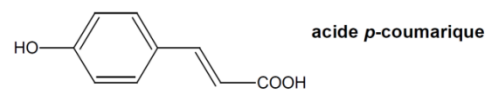
Agents réducteurs	Sulfite et dérivés Acide ascorbique et analogues Cystéine et glutathion
Agents chélateurs	Phosphates EDTA Acide organiques
Acidifiants	Acide citrique phosphorique
Inhibiteurs d'enzyme	Acides carboxyliques aromatiques Alcools aliphatiques Anions Peptides Résorcinols substitués
Traitements enzymatiques	Oxygénases <i>o</i> -Méthyltransférase Protéases
Agents complexant	Cyclodextrines



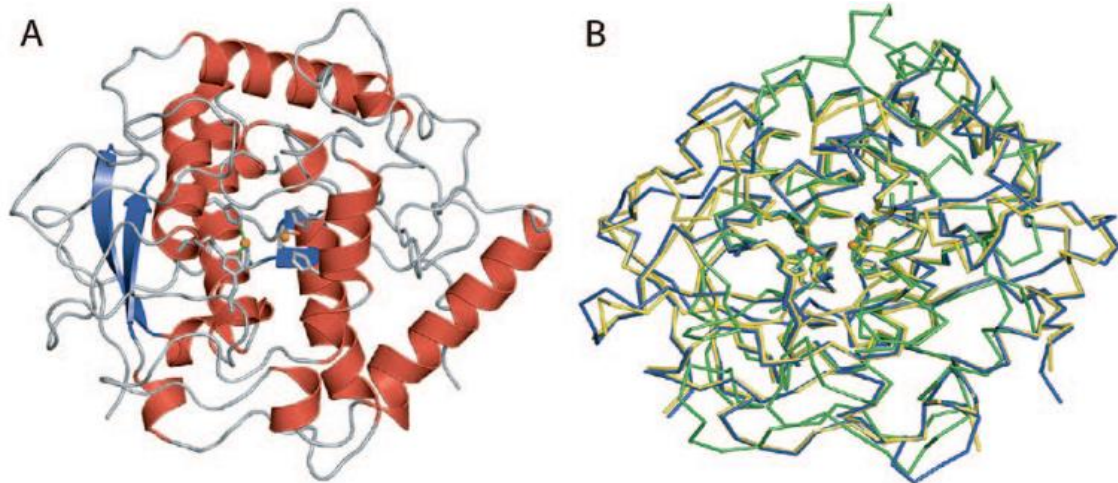
Série des acides benzoïques



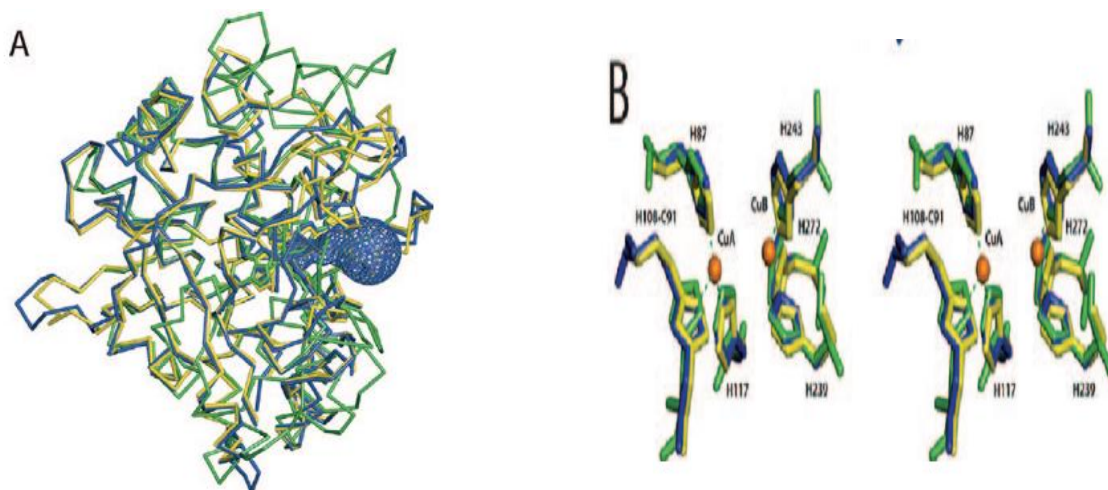
Série des acides cinnamiques



Annexe 06: Structure de composés phénoliques substrats des polyphénols oxydases (CHERLOT, 2007)



Annexe 07: Diffraction aux rayons X de la PPO de *V. vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, les deux β -feuilles (Bleu), les quatre hélices (Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Cade *V. vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa*(vert).



Annexe 08: Site actif de la PPO de *V. vinifera* PPO (bleu) et la patate douce(jaune) et *N. crassa* enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER, (b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres, la distance internucléaire était: Cu-Cu, 4,17Å; CuA à H87, 2,07°; à H108, 2,16°; H117, 2,35°; CuB à H239, 2,04Å; à H243, 2,15Å; à H272, 2,02Å

Annexe 09: Tableau représente les valeurs d'IC₅₀ de quelques inhibiteurs de la PPO

Inhibiteurs	Sources	IC ₅₀ (mM)	Références
Acide benzoïque	Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	1.00 0.147	Chen et al., 2003 Gouzi et al.,2010
	Plaqueminier (<i>Diospyros kaki</i>)	5.00	Arzu et al., 2004
Azide de sodium	Champignons de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	3.20	Gouzi et al.,2010
	Plaqueminier (<i>Diospyros kaki</i>)	6.00	Arzuet al., 2004
	Artichauts (<i>Cynarascolymus</i>)	0.0911	Aydemir, 2004
Fluorure de sodium	Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	123,94	Gouzi et al., 2010
Acide oxalique	Champignons de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	1,1	Son et al., 2000
	Artichauts (<i>Cynarascolymus</i>)	0.194	Aydemir, 2003
	Plaqueminier (<i>Diospyros kaki</i>)	0.0331	Arzu et al., 2004
Acide ascorbique	Champignons de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	0.24	Golan et Whitakes.,1984
	Artichauts (<i>Cynarascolymus</i>)	0.0183	Tülin, 2004
	Laitue (<i>Lactuca sativa var. capitata L.</i>)	4.61	Urszula et al., 2007
Cyanure de potassium	Céleri(<i>Apiumgraveolens L.</i>)	2.8.10 ⁻⁵	Aydemir&Akkanli, 2006
Acide citrique	Champignon de Paris (<i>Agaricusbisporus</i>)	150	Son et al., 2000
	Laitue (<i>Lactuca sativa var. capitata L.</i>)	62.91	Urszula et al., 2007
Chlorure de sodium	Banane (<i>Musa cavendishii</i>)	50	Ümit, 2005